

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 24 Octobre 2022 par

Robin F. Dard

Évolution de l'activité de la région CA1 de l'hippocampe pendant le développement postnatal précoce.

Discipline

Biologie santé

Spécialité

Neurosciences

École doctorale

**ED - 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ**

Laboratoire/Partenaires de recherche

Institut de Neurobiologie de la
Méditerranée (INMED), INSERM, U1249

Composition du jury

- Lisa ROUX Rapportrice
Chargée de recherche, IINS, Bordeaux
- Vincent VILLETTE Rapporteur
Chargé de recherche, IBENS, Paris
- Claire WYART Examinatrice
Directrice de recherche, ICM, Paris
- David DUPRET Examineur
Professeur, Université d'Oxford, Oxford
- Franck DEBARBIEUX Examineur
Maître de conférences, INT, Marseille
- Christophe PORCHER Président du jury
Professeur des universités, INMED, Marseille
- Michel PICARDO Co-Directeur de thèse
Chargé de recherche, INMED, Marseille
- Rosa COSSART Directrice de thèse
Directrice de recherche, INMED, Marseille

Affidavit

Je soussigné, Robin Dard, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Rosa Cossart et Michel Picardo, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 17 juin 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Affidavit

I, undersigned, Robin Dard, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Rosa Cossart and Michel Picardo, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism. This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Marseille, date 17 juin 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications¹ réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Denis, J.*, Dard, R. F.*, *et al.* (2020). DeepCINAC: A Deep-Learning-Based Python Toolbox for Inferring Calcium Imaging Neuronal Activity Based on Movie Visualization. *eNeuro*
2. Dard, R. F. *et al.* (2022). The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion. *eLife*
3. Leprince, E.*, Dard, R.F.* *et al.* (2022). Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits. *BioRxiv (en révision, Neuron)*

2) Participation aux conférences² et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. Poster : NeuroFrance, May 2019, Marseille, France
2. Poster : Neurodynamics Symposium, July 2019, Grenoble, France
3. Poster : Neuroscience 2019 (SfN), Society for Neurosciences, October 2019, Chicago, US
4. Poster : Fresh look on inhibition congress, April 2022, Marseille, France
5. Oral : The Inaugural ANS Developmental Neuroscience Forum (ADNF) PhD/ECR Seminar Blitz, December 2020
6. Workshop : NWB / DANDI developers hackathon, 2022

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

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

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

Résumé

Ce travail de thèse a permis dans un premier temps de décrire les patrons d'activités observés *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe de lors des deux premières semaines de vie postnatales chez la souris. Dans un second temps nous avons disséqué les circuits neuronaux soutenant ces activités. Enfin, nous nous sommes intéressés à comprendre en quoi l'activité participait au développement anatomique et fonctionnel de CA1.

Nos résultats mettent en évidence le lien déjà établi entre un retour de l'information sensorielle lié aux myoclonies du sommeil de la souris et une activation dans la région de CA1 de l'hippocampe lors de la première semaine de vie. En utilisant une approche de chimio-génétique nous avons pu étudier l'influence, lors de cette première semaine, d'autres régions se projetant sur CA1. Ainsi, nous avons pu montrer que les informations sensorielles étaient relayées à l'hippocampe via le cortex entorhinal, comme cela était suggéré par Valeeva et collaborateurs. Des résultats *in vitro* montrent que le noyau reuniens pourrait également moduler l'activité de CA1, nos résultats *in vivo* montrent que ce noyau serait lui impliqué dans la modulation de l'activité des cellules pyramidales, mais pas dans leur synchronisation. Nous avons mis en évidence une inversion rapide de la relation entre mouvement et activité autour du neuvième jour postnatal (P9). En effet, alors que le mouvement était suivi d'une activation dans CA1 avant P9, il entraîne une forte réduction de l'activité à des stades plus tardifs. Cette transition dans l'activité du réseau de CA1, en réponse au retour sensoriel, coïncide avec l'âge auquel nous avons observé un développement rapide de l'innervation périssomatique inhibitrice sur les cellules de la couche pyramidale de CA1. Elle est également marquée par l'émergence d'activités en dehors des périodes de mouvements, ce qui traduit le désengagement de l'hippocampe des inputs sensoriels. Enfin, nous avons pu montrer que le développement de l'innervation périssomatique issu des interneurons à parvalbumine (PV) dépendait en partie de l'activité des interneurons somatostatinergergiques de l'hippocampe puisque en inhibant ces derniers, nous affectons le développement axonal des neurones PV.

Abstract

This thesis work first described the activity patterns observed *in vivo* in the CA1 region of the hippocampus in mice during the first two weeks of postnatal life in mice. We then sought to understand the neural circuits supporting these activities. Finally, we were interested in understanding how the activity contributes to the anatomical and functional development of CA1.

Our results highlight the already established link between sensory feedback related to mouse sleep twitches and activation in the CA1 region of the hippocampus during the first week of life. Using a chemogenetic approach we could study the influence of other regions projecting to CA1 during the first week of life. Thus, we could show that, as suggested by Valeeva and colleagues, sensory information is relayed to the hippocampus via the entorhinal cortex. *In vitro* results show that the reuniens nucleus could also modulate CA1 dynamics. In addition, *in vivo* results show that this nucleus would be involved in the modulation of the activity of pyramidal cells but not in their synchronization. We have shown a rapid inversion of the relationship between movement and activity around postnatal day nine (P9). Indeed, whereas movement was followed by activation in CA1 before P9, it leads to a strong reduction of activity at later stages. This transition in CA1 dynamics in response to sensory feedback coincides with the age at which we observed a rapid development of inhibitory perisomatic innervation onto CA1 pyramidal cells. This transition is also marked by the emergence of activity outside the periods of movement, which reflects the disengagement of the hippocampus from sensory inputs. Finally, we could show that the development of perisomatic innervation from parvalbumin expressing interneurons depends at least in part on the activity of hippocampal somatostatin interneurons.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée sous la codirection de Michel Picardo et Rosa Cossart. Je souhaite remercier les docteurs Lisa Roux et Vincent Villette d'avoir accepté d'être rapporteurs, les docteurs Claire Wyart, David Dupret et Franck Debarbieux d'être examinateurs de mon travail de thèse. Je remercie également le docteur Christophe Porcher d'avoir bien voulu présider ce jury de thèse.

En premier lieu je tiens à remercier Michel et Rosa pour ces 4 années de direction de thèse. Rosa il aura quand même fallu insister un peu pour pouvoir rejoindre l'équipe en stage mais finalement je suis venu et je suis resté un peu plus, merci. Merci infiniment pour toutes les discussions qui ont grandement enrichi ce projet de thèse, qui m'ont aidé scientifiquement et personnellement. Merci aussi pour ton soutien et pour la confiance que tu as eu dans notre trio avec Michel et Julien.

Michel, je ne sais pas si j'aurais pu demander mieux ! 4 ans et toujours présent et motivé. Merci pour ta volonté de toujours faire plus, mieux et plus vite, c'est stimulant et motivant. Un grand merci pour ton soutien tout au long de la thèse. On aura fait une belle équipe, bien travaillé et bien ri aussi, des manips au labo jusqu'à Agava. Ne change rien, et si un jour tu finis par avoir un labo au bord du lac de la 'Venise des Alpes' n'hésite pas à m'appeler !

Merci également à tous les membres de l'équipe qui ont été présents tout au long de ma thèse. Evidemment merci à Julio, entre le trail, le vélo et le travail, c'était fait pour marcher et on aura quand même bien envoyé que ce soit au labo ou à la montagne ! Merci Erwan pour le travail en commun pendant les deux dernières années, merci pour ta capacité à râ.t'exprimer, on t'aime comme ça. Comme dirait Michel 'Faut pas rester là monsieur', un jour tu vas surement traverser la Manche et finalement partir en postdoc, pas de panique tu y réussiras très bien. Catherine, je vais soutenir ma thèse un lundi, j'espère que ça ira un peu mieux que le 'oh comme un lundi' auquel tu nous as habitué quand on te demandait comment ça allait. Merci pour ton aide précieuse avec toutes les manips 'urgentes' d'histo que je t'ai demandé pendant 4 ans. Merci Agnès, tu nous l'auras répété beaucoup à Michel et moi, mais finalement je vais partir avant que tu ne changes de bureau, comme quoi il faut croire que tu arrivais encore à nous supporter Michel et moi ! Merci infiniment pour ton aide et surtout pour ta bienveillance au quotidien. Jean-Claude, merci pour tous les conseils et discussions sur nos manips et résultats, la thèse en générale et la poursuite en postdoc. Merci aussi d'avoir été là pour remettre du rythme dans le quotidien de l'équipe et pour tous les petits pics que tu lances, c'était un peu frustrant de devoir écrire cette thèse plutôt que de te monter une belle manip d'imagerie, mais ce n'est pas encore tout à fait fini il reste encore le temps additionnel. Merci à Aurélie pour les gâteaux, les chocolats, les cookies que tu apportes au bureau, et merci pour avoir partagé Michel. Merci à Pierre-Pascal pour tes remarques et conseils tout au long de la thèse. Merci à tous ceux de l'équipe qui ont aidé à un moment ou un autre : les dernières arrivées Mirindra, Marina, Caro mais aussi Marie, Salomé, Artem, Richard. Les anciens postdocs et thésards qui m'ont aidé à bien commencer : Laura, Marco, Claire, Thomas, Yannick, Davide.

Aux sportifs du labo : l'équipe 'staps' Jérôme, Nicolas, Marine, Caro pour votre bonne humeur et les soirées foot, Arnaldo pour les sorties courses, Clément pour les discussions de couloirs et pour les week-ends ski.

Merci à Fabien et à toute l'équipe de l'OM trail pour la bonne ambiance à l'entraînement et en course. C'est toujours un plaisir de parcourir les calanques avec vous et vous m'avez presque fait aimer la piste. Merci à Antoine et à tout le groupe 'OM bike', plusieurs belles sorties au compteur et plusieurs fois à finir par voir flou. Merci à Alexis pour les visites guidées en Belledonne, les sorties vélo et bien sûr pour la RGA en attendant les Pyrénées. Enfin merci à ma famille.

SOMMAIRE

Affidavit	2
Affidavit	3
Liste de publications et participation aux conférences.....	4
Résumé	5
Abstract	6
REMERCIEMENTS	7
SOMMAIRE	8
LISTE DES FIGURES.....	11
AVANT-PROPOS.....	12
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1 : L’hippocampe chez la souris adulte.....	15
1.1 Description anatomique brève	15
A – La structure de l’hippocampe	15
B – La connectivité de l’hippocampe.....	15
a – La connectivité interne de l’hippocampe	15
b – La connectivité externe de l’hippocampe:	16
C – Les cellules de l’hippocampe.....	17
a- Les cellules pyramidales et leur diversité	17
b- Les interneurons et leur diversité	18
1.2 L’activité du réseau de la région CA1 de l’hippocampe en lien à sa fonction	21
CHAPITRE 2 : L’activité dans l’hippocampe en développement	23
2.1 L’activité du réseau hippocampique pendant les deux premières semaines postnatales.....	23
A – L’apport des études <i>in vitro</i>	23
B – L’apport des études <i>in vivo</i>	24
2.2 Focus sur le rôle des interneurons hubs dans l’activité de CA1	27
CHAPITRE 3 : Comment l’activité du développement précoce façonne les réseaux adultes	28
3.1 Participation de l’activité précoce au développement : exemples dans le cortex.....	28
A- Apport de l’étude du cortex visuel	28
B- Apport de l’étude du cortex en barils	29
C - Synthèse	30
3.2 Emergence et maturation de l’innervation périsomatique inhibitrice	31
A- Maturation de l’innervation périsomatique inhibitrice et période critique.....	31
B- Une maturation de l’innervation périsomatique inhibitrice activité-dépendante	32
3.3 Focus sur le rôle des “twitches” dans la maturation des circuits de neurones	32

A – Que sont les “twitches” : définition.....	32
B – Twitches et maturation de la moelle épinière et du cortex moteur	37
C – Twitches et maturation de l’axe thalamo-cortical.....	37
D – Twitches et maturation du circuit hippocampo-entorhinal.....	37
CHAPITRE 4 : Objectifs du travail de la thèse présentée.....	39
4.1 Origine et évolution.....	39
4.2 Présentation des objectifs.....	39
MATERIELS, METHODES ET LIMITATIONS	41
1. Injection virale chez la souris nouveau-née	42
1.1 Injection intraventriculaire à P0 de l’indicateur calcique GCaMP6s	42
1.2 Injections virales stéréotaxiques à P0.....	42
1.3. Injections virales stéréotaxiques chez le souriceau entre P5 et P9	42
2. Chirurgie pour l’imagerie calcique <i>in vivo</i> dans l’hippocampe chez le souriceau	42
2.1 Méthode développée :	42
2.2 Limitations	42
3. Acquisition des données.....	43
3.1. Données d’imagerie : principes et limites	43
3.2. Comportement du souriceau lors de l’imagerie.....	44
4. Préanalyse des données d’imagerie calcique.....	44
4.1 Limitations des méthodes préexistantes	45
4.2 Développement d’une nouvelle méthode de préanalyse	45
5. Analyse des données	46
5.1 Format NWB	46
5.2 Développement de la suite d’analyse CICADA	47
RESULTATS.....	49
1. Articles de thèse :	50
1.1 Article méthodologique : Denis J., Dard R.F. et al	50
A- Résumé.....	50
B- Article.....	50
1.2 Article expérimental : Dard R.F. et al	51
A- Résumé.....	51
B- Article.....	51
1.3 Article expérimental : Leprince E, Dard R.F. et al	52
A- Résumé:.....	52
B- Contributions :	52
C- Article :	52
2. Annexe : Résultats non publiés	53

2.1 Lien entre activité et mouvement	53
2.2 Etudes des circuits contrôlant la maturation de l'innervation périsomatique	54
3. Conclusion / Synthèse sur les résultats.....	57
DISCUSSION	58
1. Objectifs partiels.....	59
1.1 Décrire la connectivité de l'hippocampe pendant le développement	59
1.2 Imagerie calcique chronique lors des deux premières semaines de vie postnatale	59
1.3. Meilleure compréhension du lien entre mouvement, activité et maturation de CA1	59
A- Influence des 'twitches' sur la maturation de la région CA1 de l'hippocampe	60
B- Modélisation de l'influence du mouvement sur l'activité de CA1	60
1.4 Rôle de l'activité précoce dans la maturation de la région CA1 de l'hippocampe.....	61
A- Participation de l'activité des interneurons hub	61
B- Participation des entrées extrinsèques.....	62
2. Un maillon manquant : imagerie de l'activité dans les 3 ^{ème} et 4 ^{ème} semaines de vie ?.....	62
2.1 Renversement de la relation mouvement-activité ?.....	62
2.2 Emergence de l'activité séquentielle et des assemblées lors de la 4 ^{ème} semaine ?	63
2.3 Contrainte développementale sur l'émergence des séquences	64
3. Désengagement des inputs sensoriels : un processus développemental commun au cortex ?	65
4. Twitches et aspects évolutifs du développement précoce	66
REFERENCES	68

LISTE DES FIGURES

Introduction

Chapitre 1

- **Figure 1.1 :** Représentation schématique de l'hippocampe et des entrées qu'il reçoit lors du développement précoce..... 17
- **Figure 1.2 :** Activité des cellules pyramidales, des interneurons en panier et de type chandelier en relation avec le comportement de la souris.....21

Chapitre 2

- **Figure 2.1 :** Evolution de l'activité dans la région de CA1 telle que décrite in vitro24
- **Figure 2.2 :** Premières caractérisations électrophysiologiques des activités synchrones récurrentes observées dans la région CA1 de l'hippocampe lors du développement postnatal précoce.25
- **Figure 2.3 :** Relation entre myoclonies du sommeil et activations successives du cortex entorhinal médian et de CA1 chez le souriceau..... 26

Chapitre 3

- **Figure 3.1 :** Composantes et évolution de la quantité de sommeil paradoxal chez le rongeur juvénile. 33
- **Figure 3.2 :** Représentation schématique des protocoles expérimentaux permettant la mise en évidence d'une génération des myoclonies du sommeil au niveau de la moëlle épinière 35
- **Figure 3.3 :** Représentation schématique des mécanismes à l'origine de la production des twitches et voies neuronales du retour sensoriel..... 36

Matériels, méthodes et limitations

- **Figure M1 :** Principe du suivi de l'activité neuronale via l'utilisation d'indicateur calcique GCaMP6.43
- **Figure M2 :** Capture écran de la BADASS GUI incluse dans CICADA..... 44
- **Figure M3 :** Capture écran de l'interface graphique fournie dans DeepCINAC..... 46
- **Figure M4 :** Illustration du processus de préanalyse des données conduisant à la création d'un fichier NWB..... 47
- **Figure M5 :** Illustration du fonctionnement de CICADA..... 48

Résultats

- **Figure R1 :** Comparaison de l'activation de la région de CA1 en réponse à 4 types de twitches pour un animal à P5..... 53
- **Figure R2 :** Inhibition chronique des interneurons SST de l'hippocampe et développement des réseaux inhibiteurs locaux de la région CA1 55
- **Figure R3 :** Inhibition chronique du cortex entorhinal et développement des réseaux inhibiteurs locaux de la région CA1 56

Discussion

- **Figure D1 :** Illustration des 3 types d'activités séquentielles caractéristiques de la région CA1 de l'hippocampe et leur mise en place au cours du développement chez le rat juvénile..... 64

AVANT-PROPOS

Le développement du cerveau et la mise en place de circuits neuronaux fonctionnels dépendent à la fois de programmes génétiques, de l'activité neuronale et d'interactions environnementales. L'équipe de Rosa Cossart que j'ai pu rejoindre pour réaliser ce travail de thèse s'intéresse entre autres à comprendre comment les propriétés fonctionnelles d'un réseau de neurones observé chez l'animal adulte émergent lors du développement. Après avoir contribué à la description de l'évolution de l'activité *in vitro* de l'hippocampe lors des phases précoces du développement (Crépel et al., 2007), puis à l'identification d'une sous-population d'interneurones générée tôt lors du développement embryonnaire, appelée neurones hubs, participant au contrôle des activités synchrones (Bonifazi et al., 2009; Picardo et al., 2011), l'équipe a montré que ces interneurones hubs conservent des propriétés anatomiques et fonctionnelles « extraordinaires » dans l'hippocampe chez l'animal adulte (Bocchio et al., 2019). Il a de plus été montré que l'âge de naissance embryonnaire des cellules pyramidales détermine en partie leur intégration dans des microcircuits hippocampiques impliqués dans différentes fonctions cognitives (Cavalieri et al., 2021; Huszár et al., 2022). Ainsi, il est mis en évidence que certains facteurs développementaux contraignent la dynamique de l'activité neuronale dans l'hippocampe chez l'animal adulte.

Au-delà de contraindre la dynamique de l'activité d'un réseau de neurones, le développement et l'activité précoce participent à l'évolution du circuit et à l'émergence des patrons d'activités observés plus tardivement. Le rôle de l'activité dans le façonnement du réseau adulte a principalement été étudié dans deux aires corticales sensorielles : le cortex visuel et le cortex en baril. L'étude du développement de ces deux aires a permis la mise en évidence de plusieurs étapes développementales et transitions dans la maturation des circuits corticaux (voir par exemple Fig. 3 (Cossart and Garel, 2022)). Plusieurs de ces transitions sont dans un premier temps dépendantes de l'activité puis également dépendantes de l'expérience de l'animal au cours de ce que l'on appelle une période critique. Ces périodes critiques dans le développement de ces aires sensorielles sont identifiables expérimentalement en altérant l'expérience sensorielle qu'elle soit visuelle ou tactile au niveau des vibrisses à un stade développemental précis (pour revues voir par exemple (Hensch, 2004, 2005)). Contrairement à ces deux régions corticales, l'hippocampe n'est pas une aire sensorielle, il n'est donc pas évident de définir une période critique ou des transitions développementales via l'altération d'une modalité sensorielle particulière. Cependant, comme ce travail de thèse le montrera le développement de l'hippocampe est également marqué par des transitions comparables à celles observées dans d'autres régions corticales.

Une courte introduction générale présentera dans un premier temps l'anatomie et les activités caractéristiques de l'hippocampe chez la souris adulte en lien avec ses fonctions cognitives, puis des études décrivant l'activité hippocampique lors des phases précoces du développement postnatal *in vitro* et *in vivo*, enfin la dernière partie de l'introduction présentera de façon plus générale un contexte développemental et notamment le rôle de l'activité dans le façonnement anatomique et fonctionnel des réseaux neuronaux.

Dans ce cadre développemental, le premier objectif de ce travail de thèse était de décrire l'évolution de l'activité dans la région CA1 de l'hippocampe au cours du développement jusqu'à l'apparition des patrons d'activités adultes tels que décrit précédemment dans l'équipe (Malvache et al., 2016; Villette et al., 2015). Pour cela nous avons mis en place un protocole expérimental permettant d'enregistrer l'activité d'une large population de neurones de la région de CA1 de l'hippocampe lors du développement postnatal précoce en utilisant une approche d'imagerie calcique à deux photons (voir méthodes), ainsi que des outils d'analyse permettant la description de l'activité enregistrée (voir résultats (Denis et al., 2020)). Cette description de l'activité lors des deux premières semaines de vie a permis la mise en évidence d'une transition majeure dans la dynamique de CA1 en début de deuxième semaine de vie (voir résultats (Dard et al., 2022)). Une deuxième étude nous a permis de décrire plus en détails les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle des activités que nous avons décrites (voir résultats (Leprince et al., 2022)). Des études en cours dans l'équipe visant à comprendre les mécanismes par lesquels l'activité observée participe au développement anatomique et fonctionnel de l'hippocampe seront brièvement présentées (voir résultats non publiés).

Enfin, une discussion reprendra d'abord les différents sous objectifs de ce travail de thèse, leurs limitations et enfin quelques poursuites possibles. Puis elle replacera ce travail dans un contexte

développemental plus large, en abordant premièrement la période développementale au cours de laquelle les patrons d'activités observés chez l'adulte apparaissent probablement (Farooq and Dragoi, 2019; Muessig et al., 2019), puis en présentant une comparaison avec les transitions développementales observées dans le cortex au même âge, enfin en discutant certains aspects évolutifs du développement.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : L'hippocampe chez la souris adulte

Ce premier chapitre a pour objectif d'introduire succinctement l'anatomie de l'hippocampe, sa connectivité interne et externe ainsi que les cellules qui le constituent. Cette première partie introduira également la mise en place des connexions intra et extra-hippocampiques au cours du développement. Dans un second temps, ce chapitre présentera brièvement certaines dynamiques neuronales en lien avec le rôle de l'hippocampe dans la navigation spatiale et la mémoire épisodique.

1.1 Description anatomique brève

Dessiné pour la première fois par Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1911), l'hippocampe est une structure dont l'anatomie a été largement décrite. Cette section présentera très rapidement premièrement la structure de l'hippocampe, puis sa connectivité interne ainsi que sa connectivité avec d'autres régions, enfin les différents types de neurones qui le constituent. Dès que possible l'aspect développemental sera introduit dans les différentes sections.

A – La structure de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure corticale bilatérale, située sous la surface du cortex, faisant partie du système limbique classiquement décrite comme impliquée dans des fonctions d'apprentissage, de mémoire et d'émotions. L'hippocampe se compose de deux structures : le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA) elle-même divisée en trois régions CA3-CA2-CA1. Le travail de thèse présenté porte spécifiquement sur l'étude de la région CA1 de l'hippocampe.

Le gyrus denté et les régions de la corne d'Ammon sont organisés en couches (aussi appelées *stratum*). En partant de la surface du cortex, des couches les moins au plus profondes, on retrouve successivement le *stratum oriens* (*so*), le *stratum pyramidale* (*sp*), le *stratum radiatum* (*sr*) et le *stratum lacunosum moleculare* (*slm*) avec spécifiquement au niveau de CA3 en plus de cela le *stratum lucidum* intercalé entre le *stratum pyramidale* et le *stratum radiatum*. Au sein de la corne d'Ammon les cellules pyramidales ont leurs corps cellulaires (ou soma) localisés dans la couche pyramidale. Ces cellules pyramidales ont leurs dendrites apicales au niveau du *stratum radiatum* et du *lacunosum moleculare* et un axone qui traverse le *stratum oriens* et se projette dans le subiculum. Les interneurons de cette région de l'hippocampe sont distribués de façon non-homogène dans l'ensemble de ces couches. Cette distribution sera présentée plus en détails ultérieurement en lien avec les différents type d'interneurones présents.

B – La connectivité de l'hippocampe

Cette section présentera premièrement la connectivité interne à l'hippocampe, entre les différentes sous régions et celle observée au sein de la région de CA1 qui est l'objet de ce travail de thèse. Ensuite elle abordera la connectivité externe de l'hippocampe et particulièrement celle du cortex entorhinal et du noyau réunis vers l'hippocampe puisque le rôle de ces connexions dans la modulation de l'activité de CA1 au cours du développement sera présenté dans la partie résultats (Leprince et al., 2022). Chacune de ces deux sous parties présentera d'abord la connectivité chez l'adulte avant de présenter leur mise en place au cours du développement.

a – La connectivité interne de l'hippocampe

Le gyrus denté et les régions de la corne d'Ammon sont connectés successivement par un circuit appelé boucle trisynaptique. Ce circuit met en jeu successivement le gyrus denté, la région de CA3 puis celle de CA1. Dans ce circuit l'information en provenance de la couche 2 du cortex entorhinal (une des principales sources de connexions entrantes sur l'hippocampe – voir section suivante) via la voie perforante atteint le gyrus denté, puis transite jusqu'à CA3 via les fibres moussues (Claiborne et al., 1986) avant de rejoindre CA1 via les collatérales de Schaffer (Shepherd and Harris, 1998). Les cellules pyramidales de la région de CA1 se projettent ensuite vers le subiculum, principale voie de sortie de l'information et vers les couches 5 et 6 du cortex entorhinal. Cette connectivité intra-hippocampique entre différentes sous-régions se met en place au cours du développement. Notamment la connectivité de CA3 vers CA1 (Figure 1.1) qui se développe à partir de P2 puis mature en fin de première semaine de vie (Durand et al., 1996; Gomez-Di Cesare et al., 1997).

En plus de ces connexions entre sous-régions, les différentes parties de la corne d'Ammon ont des connectivités locales spécifiques. La région de CA3 présente spécifiquement des connexions récurrentes entre neurones pyramidaux (Lebovitz et al., 1971; Miles and Wong, 1986). Ces connexions récurrentes participent aux activités de réseau de CA3. Notamment ce type de connexion participe à la génération des oscillations de type « sharp-wave » ou encore à la formation d'un réseau associatif permettant la complétion de patron et le rappel d'informations stockées (pour revue voir par exemple (Miles et al., 2014)). Dans la région de CA1 ces connexions récurrentes entre cellules pyramidales sont considérées absentes ou très peu nombreuses (Geiller et al., 2022) et les récurrences dans ce réseau sont portées par les connexions réciproques entre cellules pyramidales et interneurons, et notamment par les interneurons périsomatiques qui seront présentés dans une section suivante. Ces connexions locales inhibitrices dans la couche pyramidale de CA3 et CA1 émergent respectivement en fin de première semaine de vie et en début de deuxième semaine (Marty et al., 2002; Morozov and Freund, 2003). La participation du développement de la connectivité inhibitrice locale à l'évolution de l'activité de la région de CA1 au cours du développement sera présentée dans la partie résultats (Dard et al., 2022). De façon plus général ce point sera abordé dans le cadre du néocortex (voir chapitre 3, partie 3.2 et discussion).

b – La connectivité externe de l'hippocampe:

L'hippocampe est une structure intégrant un grand nombre d'entrées provenant de régions corticales et sous-corticales. Il reçoit notamment des entrées en provenance des deux autres structures de la formation hippocampique que sont le cortex entorhinal et le subiculum. L'hippocampe est également connecté entre autres au septum, au thalamus, à l'hypothalamus, à l'amygdale. Parmi ces structures, la participation du cortex entorhinal et du noyau réunis au développement de l'activité de la région de CA1 a été étudiée plus en détails dans ce travail de thèse. L'organisation anatomique de ces afférences extra-hippocampiques ainsi que leurs rôles dans l'organisation de l'activité de CA1 chez l'animal adulte est décrite de façon exhaustive dans une thèse – chapitre 2 « Rôle des afférences extra-hippocampiques sur la dynamique du réseau de CA1 adulte » (Leprince, 2021). Les deux paragraphes suivants présenteront les connexions du cortex entorhinal et du noyau réunis vers l'hippocampe.

Le cortex entorhinal est une structure hautement interconnectée avec l'hippocampe (van Strien et al., 2009; Witter, 1993; Witter et al., 2006). Du cortex entorhinal vers l'hippocampe, ces connexions se font via deux voies de projection, une voie indirecte et une voie directe. La voie indirecte consiste en la connexion entre les neurones de la couche 2 du cortex entorhinal et la couche moléculaire du gyrus denté via une voie appelée voie perforante (figure 1.1 et (Hjorth-Simonsen, 1972; Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972)). On retrouve en plus une connexion directe appelée voie temporoammonique connectant les neurones excitateurs de la couche 3 du cortex entorhinal aux neurones pyramidaux de la région de CA1 via des contacts synaptiques au niveau de la *slm* de CA1 (Witter et al., 2017). D'un point de vue fonctionnel, cette connectivité du cortex entorhinal vers l'hippocampe supporte un transfert d'informations sensorimotrices et spatiales nécessaires au rôle de l'hippocampe dans la formation de représentations mentales de son environnement par l'animal (voir par exemple Zhang et al., 2014). Ces connexions entre le cortex entorhinal et l'hippocampe se mettent en place relativement tôt lors du développement chez la souris. En utilisant des injections intra-hippocampiques de DiI, permettant de marquer les régions qui s'y projettent, il a été montré que des connexions en provenance du cortex entorhinal sont présentes à partir du jour embryonnaire (E)15 avec une arborisation dans le *lacunosum moleculare* à partir de E17 (Supèr and Soriano, 1994). Même si la nature de ces informations diffère de chez l'animal adulte, ces connexions du cortex entorhinal vers l'hippocampe sont impliquées dans la transmission vers l'hippocampe d'informations sensorimotrices lors du développement postnatal précoce (voir chapitre 2, partie 2.2.B et chapitre 3, partie 3.3). Les circuits neuronaux supportant cette connectivité entre cortex entorhinal et hippocampe ainsi que leur contribution au contrôle de l'activité dans la région de CA1 au cours du développement seront présentés dans la partie résultats (Leprince et al., 2022).

Le noyau réunis est un noyau du thalamus ventro-médian, ayant des projections excitatrices localisées dans la *slm* de CA1 (Dolleman-Van der Weel and Witter, 2000; Dolleman-Van der Weel et al., 1997). Ce noyau thalamique est progressivement apparu comme un relai majeur entre le cortex préfrontal et l'hippocampe (voir revues (Dolleman-van der Weel et al., 2019; Vertes et al., 2007)). Ce rôle de relai expliquerait par exemple comment le noyau réunis participerait au codage des trajectoires observées dans CA1 (Dolleman-van der Weel et al., 2019; Ito et al., 2015). Les connexions en

provenance du noyau réunien vers l'hippocampe en développement seraient présentes dès P1 (Hartung et al., 2016), soit bien plus tôt que la mise en place de sa fonction de relai d'information cognitive entre le cortex préfrontal et l'hippocampe. Les circuits neuronaux de CA1 permettant l'intégration de ces entrées ainsi que leur participation à l'activité de CA1 lors de la première semaine de vie postnatale seront présentés dans la partie résultats (Leprince et al., 2022).

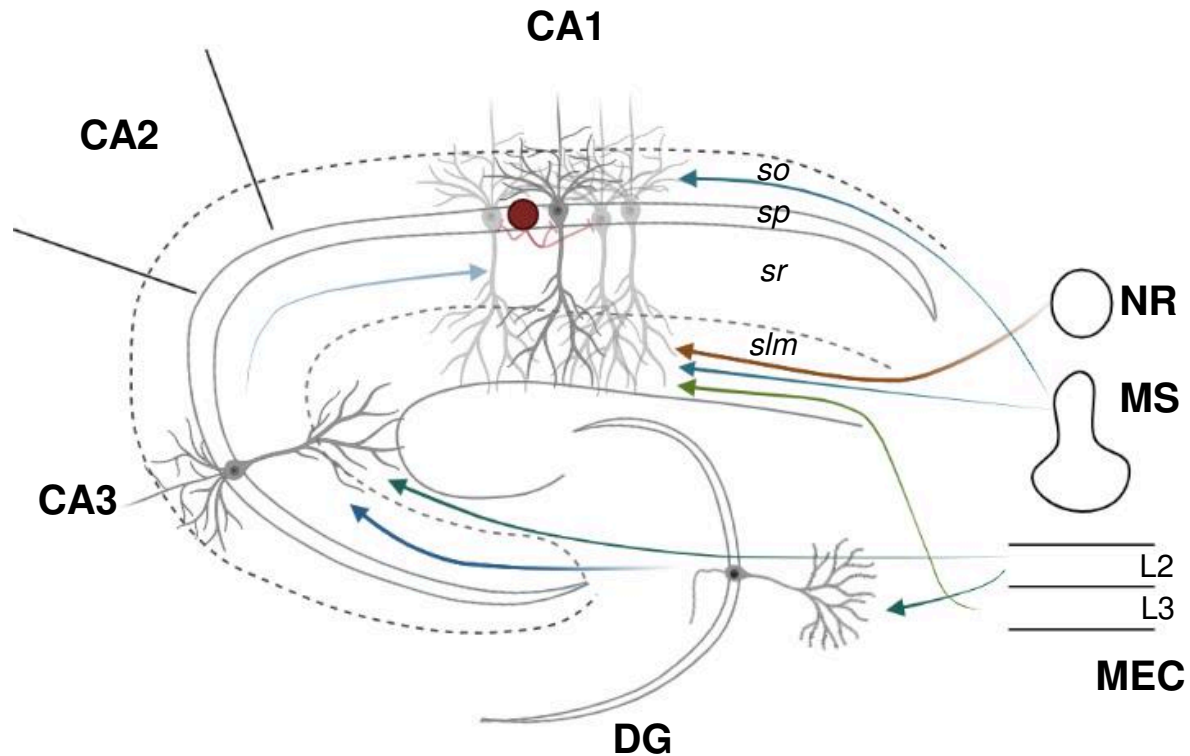


Figure 1.1 : Représentation schématique de l'hippocampe et des entrées qu'il reçoit lors du développement précoce.

On retrouve des connexions externes provenant du noyau réunien (NR) qui se projettent dans le stratum lacunosum moleculare (slm) de la région de CA1, du septum médian (MS) qui se projettent principalement dans la slm et dans le stratum oriens (so) et du cortex entorhinal médian (MEC). Les cellules excitatrices de la couche 3 du MEC se projettent sur la slm de CA1 et celles de la couche 2 (MEC L2) se projettent sur le gyrus denté (DG). Depuis le DG l'information en provenance du MEC L2 arrive jusqu'au stratum radiatum (sr) de CA1 par le circuit local de la boucle trisynaptique via les fibres moussues entre le DG et CA3, puis via les collatérales de Schaffer de CA3 vers le sr de CA1. Ces connexions locales se mettent en place de façon retardée par rapport aux connexions externes. Les connexions inhibitrices des interneurons en panier (cellule représentée en rouge dans la couche pyramidale de CA1) sur le soma des cellules pyramidales se forment également plus tardivement au cours du développement postnatal.

C – Les cellules de l'hippocampe

a- Les cellules pyramidales et leur diversité

Les cellules excitatrices de la région de CA1 de l'hippocampe, appelées cellules pyramidales dans la suite, ont originellement été décrites et pensées comme une population homogène. Cependant de nombreuses données montrent une diversité sur plusieurs aspects tels que les marqueurs moléculaires que ces neurones expriment, les afférences qu'ils reçoivent, ou les fonctions dans lesquelles ils sont impliqués (pour revues voir par exemple (Cembrowski and Spruston, 2019; Soltesz and Losonczy, 2018)). Cette diversité est notamment observée selon l'axe radial de la couche pyramidale qui peut être divisée en une couche superficielle, côté radiatum et une couche profonde, côté oriens. D'un point de vue moléculaire cette distinction est clairement visible au niveau de l'expression de la calbindine, protéine de chélation du calcium, qui est fortement présente dans la partie superficielle et pas dans la partie profonde (Slomianka et al., 2011). Au-delà de cette différence d'expression de la protéine calbindine, les couches profondes et superficielles présentent des profils d'expression différents pour plusieurs autres gènes (Cembrowski et al., 2016; Soltesz and Losonczy, 2018). A cette dichotomie entre

couche profonde et superficielle correspond une diversité des afférences reçues par les cellules pyramidales. Notamment les cellules de la couche superficielle ont plus d'entrées en provenance de CA3 et du cortex entorhinal latéral (LEC) alors que les cellules de la couche profonde reçoivent plus de contacts provenant du MEC, de CA2 ((Kohara et al., 2014; Masurkar et al., 2017) et revue (Soltesz and Losonczy, 2018)). La connexion entre les cellules pyramidales et les interneurons en panier exprimant la parvalbumine diffère également entre les couches profondes et superficielles. En effet, ces interneurons reçoivent plus de contacts provenant des cellules de la couche superficielle et contactent en retour préférentiellement les cellules de la couche profonde (Lee et al., 2014). Enfin, l'appartenance à la couche profonde ou superficielle détermine également en partie la participation des cellules pyramidales aux activités de réseau de la région de CA1. Par exemple, les cellules de la couche superficielle participent plus aux « sharp-wave ripples » alors que celles de la couche profonde ont une meilleure représentation d'une zone de récompense (pour revue voir (Soltesz and Losonczy, 2018)). De façon intéressante cette différence selon l'axe radial de la couche pyramidale s'explique en partie par des facteurs développementaux.

Au sein de cette couche, l'organisation de ces somas selon l'axe radial est dominée par l'âge de naissance des cellules. Les cellules pyramidales générées les plus tôt au cours de l'embryogenèse (vers E12.5) sont majoritairement localisées dans la moitié de la couche pyramidale appelée couche profonde, au contraire les cellules générées plus tardivement (vers E16.5) sont localisées dans la couche superficielle. En plus de déterminer leur position au sein de la couche pyramidale, l'âge de naissance embryonnaire des cellules pyramidales est un facteur influant sur leurs propriétés morphologiques et fonctionnelles ainsi que sur leur connectivité (Cavalieri et al., 2021; Marissal et al., 2012). Tout récemment il a aussi été montré que les cellules pyramidales générées au même stade embryonnaire ont tendance à présenter des activités plus corrélées entre elles et de prendre part aux mêmes assemblées neuronales que des cellules générées à des âges différents (Huszár et al., 2022). Ici, il est possible de conclure que le développement contraint la dynamique de l'activité neuronale du réseau hippocampique.

b- Les interneurons et leur diversité

Les interneurons de l'hippocampe forment une population diverse. Cette diversité parmi les interneurons est connue depuis leur première description anatomique montrant une forte diversité morphologique (Lorente De Nó, 1934; Ramon y Cajal, 1911) mais elle se traduit aussi par une diversité des propriétés électrophysiologiques et des fonctions différentes dans le contrôle et la modulation de la décharge des cellules pyramidales. A cette diversité correspond une diversité de l'origine des interneurons lors de l'embryogenèse, à la fois au niveau de leur lieu de genèse et de leur date de naissance. Plusieurs revues ont couvert de manière exhaustive ce sujet (voir par exemple (Freund and Buzsáki, 1996; Kepecs and Fishell, 2014; Pelkey et al., 2017; Somogyi and Klausberger, 2005)). Cette section présentera succinctement certains des points développés dans ces revues. De façon simplifiée il est possible de diviser les interneurons en trois grandes catégories en fonction de la localisation des contacts qu'ils forment sur les cellules pyramidales. Ainsi on distingue : i) les interneurons axo-axoniques formant un contact au niveau du segment initial de l'axone d'une cellule pyramidale, ii) les interneurons ciblant les dendrites distales des cellules pyramidales, iii) enfin les interneurons périssomatiques ciblant le corps cellulaire des cellules pyramidales (voir aussi revue (Kubota et al., 2016)). Cette section traitera successivement de ces trois types d'interneurons.

Les interneurons axo-axoniques de l'hippocampe, aussi appelés neurones en chandelier, forment des synapses sur le segment initial de l'axone des cellules pyramidales (Li et al., 1992; Somogyi et al., 1983), ils participent au contrôle de l'émission de potentiels d'action par les cellules pyramidales et donc à la sortie d'information depuis ces cellules. Ces interneurons expriment la parvalbumine (Katsumaru et al., 1988), en plus de ce marqueur commun avec d'autres types d'interneurons, il a plus récemment été montré qu'ils peuvent être identifiés grâce à l'expression du récepteur Unc5b dont l'expression est hautement spécifique des neurones axo-axoniques (Dudok et al., 2021a; Paul et al., 2017). L'enregistrement électrophysiologique *in vivo* de l'activité de ces interneurons montre que leur décharge de potentiels d'action se fait principalement au pic de l'oscillation thêta et peu lors des « sharp-wave ripples » (Klausberger et al., 2003; Viney et al., 2013). L'utilisation du marqueur Unc5b combinée à l'imagerie *in vivo* à deux photons a permis plus récemment d'étudier l'activité de ces interneurons dans le réseau de CA1 chez la souris en comportement (Dudok et al., 2021a). Cette étude montre que les interneurons en chandelier sont activés lors du déplacement ou en association avec des mouvements des vibrisses (Figure 1.2) mais, comme attendu, relativement peu actifs lors des « sharp-wave ripples » ,

de plus leur inhibition lors d'une tâche de navigation spatiale conduit à la formation de nouveau champ de lieu des cellules pyramidales (Dudok et al., 2021a). De par leur contrôle de la décharge des cellules pyramidales, ils participent donc activement à la régulation des fonctions de l'hippocampe chez la souris adulte. La mise en place des connexions entre interneurons axo-axoniques et cellules pyramidales au cours du développement n'est pas détaillée dans l'hippocampe, mais plus dans le néocortex. Dans les couches 1 et 2 du cortex somatosensoriel primaire, les interneurons en chandelier ont dès P18 un patron d'innervation semblable à celui observé chez l'adulte à P90 (Inan et al., 2013). Dans le néocortex, c'est entre P12 et P18 et notamment entre P14 et P16, que l'arborisation axonale des interneurons axo-axoniques se développe, de façon concomitante est observée une forte augmentation du nombre de cellule pyramidales contactées par un interneurone en chandelier unique, ainsi qu'une augmentation abrupte du nombre de synapses formées sur un segment initial (Pan-Vazquez et al., 2020). Le développement de l'arborisation axonale des interneurons en chandelier est également associé à une réorganisation de la localisation des synapses nouvellement formées (Steinecke et al., 2017) qui serait dépendante de l'action de la microglie (Gallo et al., 2022). Puisque ces interneurons ont un soma localisé au niveau de la couche pyramidale, il est très probable que ce type d'interneurons ait été imagé lors des enregistrements en imagerie calcique présentés dans la partie résultats (Dard et al., 2022).

Les interneurons ciblant les dendrites distales des cellules pyramidales regroupent plusieurs types d'interneurons distribués dans plusieurs couches de l'hippocampe. Parmi eux on retrouve les interneurons O-LM, les neurones associés à la voie perforante, les neurones en forme de glie (appelés NGF dans la suite), les neurones bistratifiés. Parmi ces interneurons, cette section se concentrera sur les interneurons O-LM, dont nous avons probablement enregistré l'activité (Dard et al., 2022), et sur les NGF dont nous avons étudié le rôle dans l'intégration des entrées extra-hippocampiques lors du développement (Leprince et al., 2022). Les interneurons de type O-LM doivent leur nom à la position de leur corps cellulaire au niveau du *stratum oriens* (O) ainsi qu'à leur dendrites horizontales dans cette même couche et un axone contactant les dendrites apicales des cellules pyramidales dans le *stratum lacunosum moleculare* (LM) (McBain et al., 1994). Les terminaisons des interneurons O-LM au niveau du *slm* contactent les dendrites distales des cellules pyramidales (Maccaferri et al., 2000) et les interneurons du *slm* (Katona et al., 1999). Cette morphologie permet aux O-LM de contrôler les entrées excitatrices dans le *slm*, notamment celles provenant du cortex entorhinal via la voie temporoammonique (Katona et al., 1999). L'enregistrement *in vivo* de l'activité électrophysiologique de ces interneurons montre qu'il sont principalement actifs au niveau du creux de l'oscillation thêta, juste avant les cellules pyramidales et non actifs lors de « sharp-wave ripples » (Klausberger et al., 2003). Ces interneurons O-LM expriment la SST (Oliva et al., 2000). L'activité des interneurons SST du *so*, incluant donc les O-LM, a été décrite en imagerie *in vivo* à deux photons chez la souris naviguant dans un environnement virtuel (Arriaga and Han, 2017). Dans cette étude les auteurs montrent que la majorité des interneurons SST (75%) ont une activité positivement corrélés avec la vitesse de la souris. Le développement des connexions entre les O-LM et les cellules pyramidales dans le *slm* ou l'activité *in vivo* de ces interneurons lors du développement n'est à ma connaissance pas décrit. Comme cela sera introduit dans le chapitre suivant (Chapitre 2 ; partie 2.2) certains interneurons exprimant la SST et localisés dans l'oriens font partie des interneurons générés les plus tôt au cours de l'embryogenèse, cependant les interneurons O-LM n'en font probablement pas partie (Picardo et al., 2011). Les NGF sont des interneurons localisés dans le *slm* ou dans la partie superficielle du *sr*, l'identification de ces cellules est faite à partir de leur morphologie caractérisée par une arborisation dendritique et axonale locale qui rappelle la forme d'une cellule gliale (Khazipov et al., 1995; Vida et al., 1998). Ces cellules sont idéalement situées pour contrôler les entrées excitatrices arrivant dans le *slm* de CA1 notamment celles de la couche 3 du MEC via la voie temporoammonique (Capogna, 2011; Price, 2005; Price et al., 2008) ou pour l'intégration de celles du noyau réuniens (Dolleman-Van der Weel and Witter, 2000; Dolleman-Van der Weel et al., 1997; Dolleman-van der Weel et al., 2019). Le développement de la connectivité des cellules NGF et leur intégration dans le réseau local de CA1 au niveau du *slm* est peu connu. Le développement anatomique et fonctionnel des NGF ainsi que leur intégration correcte au circuit de l'hippocampe dépend de la présence du récepteur NMDA (Chittajallu et al., 2017). Au cours du développement les NGF reçoivent des entrées excitatrices provenant des cellules de Cajal-Retzius qui participeraient au développement des NGF (Quattrocchio and Maccaferri, 2014). Les NGF contactent en retour les cellules de Cajal-Retzius qui reçoivent également des contacts provenant des O-LM (Quattrocchio and Maccaferri, 2013). La partie résultats présentera une étude détaillant les circuits du *slm*

de CA1 impliqués dans l'intégration des entrées du cortex entorhinal et du noyau reuniens en lien avec les NGF (Leprince et al., 2022).

Après les interneurons ciblant le segment initial de l'axone et ceux ciblant les dendrites distales des cellules pyramidales, le dernier grand groupe est constitué par les interneurons périssomatiques, aussi appelés cellules en panier, ciblant le corps cellulaire des cellules pyramidales. Dans l'hippocampe ils peuvent être divisés en deux catégories : les interneurons en panier exprimant la CCK (CCKBCs) et ceux exprimant la parvalbumine (PVBCs). Les PVBCs sont moléculairement définies par l'expression de la parvalbumine qui peut être détectée à partir de P10-12 et augmente jusqu'à P30 (Alcántara et al., 1993). Ces interneurons ont leurs somas majoritairement localisés dans la couche pyramidale (70%) ou à proximité dans le *so* (24%) et *sr* (6%) (Pelkey et al., 2017) et ont plus tendance à innervier la moitié profonde de la couche pyramidale (Lee et al., 2014). Les PVBCs ont un patron de décharge rapide (fast spiking cells) c'est-à-dire que ces interneurons maintiennent un taux de décharge élevé sans changement du délai entre deux potentiels d'action lors d'un bloc dépolarisant (Tricoire et al., 2011). Ces interneurons sont actifs lors de la phase descendante de l'oscillation thêta et fortement activés lors des ripples au moment du creux de cette oscillation (Klausberger et al., 2003). Dans le circuit local de CA1, les PVBCs et les cellules pyramidales sont interconnectées. En effet les PVBCs reçoivent des entrées excitatrices des cellules pyramidales avec un biais pour celles de la couche superficielle (Lee et al., 2014). Cette connexion réciproque entre cellules pyramidales et PVBCs est impliquée dans l'inhibition retour des cellules pyramidales (Lee et al., 2014; Nitsch et al., 1990) mais aussi dans la génération des ripples dans CA1 (Stark et al., 2014). Les CCKBCs sont caractérisées par l'expression du récepteur au cannabinoïde de type 1 (CB1) (Bodor, 2005; Pelkey et al., 2017). La majorité des CCKBCs a un soma localisé dans le *sr* (Cope et al., 2002; Pelkey et al., 2017) avec une arborisation axonale dans la couche pyramidale. Cependant, contrairement aux PVBCs, les CCKBCs ne montrent pas de biais de connectivité entre les deux parties de la couche pyramidale (Lee et al., 2014) et ont un patron de décharge différent dit adaptatif (adapting cells), c'est-à-dire avec une augmentation du délai entre deux potentiels d'action lors du bloc dépolarisant (Tricoire et al., 2011). L'enregistrement *in vivo* des CCKBCs montrent que ces interneurons sont actifs lors de la phase ascendante de l'oscillation thêta avec en moyenne une absence de corrélation entre leur taux de décharge et l'occurrence de ripples (Klausberger et al., 2004). L'organisation de l'activité des PVBCs et CCKBCs par rapport à l'oscillation thêta et aux ripples présente donc une certaine complémentarité (Klausberger et al., 2004). Le rôle complémentaire de ces deux populations d'interneurons périssomatiques a été décrite plus en détails chez la souris en comportement dans une étude récente utilisant l'imagerie *in vivo* biphotonique (Dudok et al., 2021b). Cette étude montre que ces deux populations d'interneurons fournissent une inhibition de façon alternée selon le comportement de la souris (Figure 1.2). Les neurones PV s'activent lors du déplacement de l'animal et au moment des ripples. En miroir l'activité des interneurons CCK est augmentée lors des phases d'immobilité mais réduite lors des ripples (Dudok et al., 2021b). Le développement de l'arborisation axonale des CCKBCs et des PVBCs semble être une étape critique dans l'évolution du réseau neuronal de CA1, ce point sera abordé dans le chapitre 3 (Chapitre 3 ; partie 3.2) puis dans la partie résultats (Dard et al., 2022).

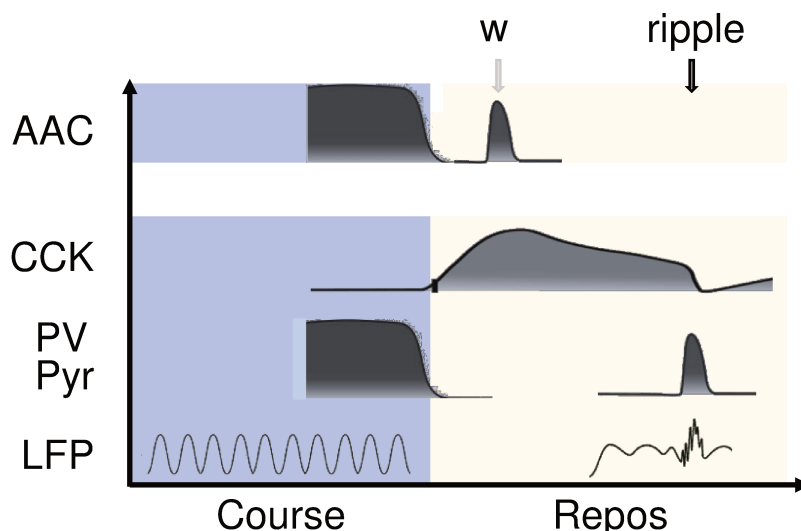


Figure 1.2 : Activité des cellules pyramidales, des interneurons en panier et de type chandelier en relation avec le comportement de la souris.

Partie haute : Représentation schématique du niveau d'activité des interneurons axo-axoniques (AAC) chez la souris adulte en comportement de course, au repos, et en association avec les mouvements de vibrisses (w) (adaptée de (Dudok et al., 2021a)). Partie basse : Représentation schématique du niveau d'activité des interneurons en panier CCK et PV et des cellules pyramidales lors des phases de course et d'immobilité et en association avec les oscillations de types ripples (ripple) (adaptée de (Dudok et al., 2021b)). Le champ local de potentiel (LFP) associé à la locomotion et aux ripples est représenté en-dessous.

1.2 L'activité du réseau de la région CA1 de l'hippocampe en lien à sa fonction

Chez l'humain plusieurs études ont montré que des dommages ou une ablation de l'hippocampe entraînaient une altération de plusieurs processus cognitifs. En effet, chez l'humain, l'hippocampe participe notamment à la formation de la mémoire sémantique et épisodique mais aussi dans la mémoire de reconnaissance ou encore dans la formation d'une représentation spatiale de l'environnement (voir revue (Bird and Burgess, 2008)). Chez le rat ou la souris l'hippocampe a été étudié pour son rôle dans la navigation spatiale avec notamment la découverte des cellules de lieu (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Cette description de l'activité en lien avec la position de l'animal dans son environnement a orienté la description de l'hippocampe comme une structure critique pour la navigation spatiale. Chez ces rongeurs il a également été montré que l'hippocampe participe à la mise en place d'une mémoire de peur conditionnée à un indice ou à un contexte (Anagnostaras et al., 2001; Sanders et al., 2003). Cela montre le rôle de l'hippocampe dans la formation d'une mémoire que l'on pourrait qualifier d'épisodique chez le rongeur. La section suivante reviendra sur ces deux points et présentera un concept plus récent qui permet d'unifier ces deux aspects des fonctions de l'hippocampe (Buzsáki and Moser, 2013).

Les expériences de Tolman ont permis de montrer que les rats étaient capables de construire une représentation mentale de leur environnement permettant d'y naviguer de façon optimale entre un point de départ et un but (Tolman, 1948; Tolman et al., 1946). Suite à l'identification des cellules de lieu dans l'hippocampe (O'Keefe and Dostrovsky, 1971) cette structure et ces cellules ont été proposées être le substrat neuronal de cette capacité. Aujourd'hui il est admis que l'hippocampe combine deux types d'informations dans la construction de cette représentation de l'environnement : les informations idiothétiques ou autoréférencées, et les informations allocentriques ou liées à l'environnement. Les informations autoréférencées, aussi dites internes, sont proprioceptives, vestibulaire ou liées au flux optique et sont générées par le mouvement de l'animal. Le rôle de ces informations est par exemple mis en évidence par l'existence d'activations neuronales séquentielles récurrentes corrélées à la course de l'animal dans un environnement dépourvu d'indice sensoriel (Pastalkova et al., 2008; Villette et al., 2015). Dans ce contexte, les séquences d'activation neuronale permettent simultanément l'intégration d'informations spatiale et temporelle (Haimerl et al., 2019). Dans des environnements plus riches en indices sensoriels, permettant une navigation allocentrique, ces séquences permettant la formation d'une

représentation spatiale s'enrichissent et incluent des cellules de lieu associées aux indices externes (Knierim et al., 1998; Save et al., 2000). Récemment, en utilisant une approche combinant imagerie calcique et stimulation optogénétique ciblée sur des cellules de lieu hors de leur champ de lieu, il a été montré qu'il était possible d'induire le comportement que la souris aurait eu au niveau du champ de lieu des neurones stimulés. Cette étude conclue donc que les cellules de lieu permettent à l'animal de construire une représentation de l'environnement dans lequel il se déplace (Robinson et al., 2020). Le rôle de l'hippocampe dans la formation et l'utilisation d'une représentation mentale de l'environnement pour la navigation dépend donc bien de l'activation séquentielle de neurones de la région CA1.

L'hippocampe est également lié à la mémoire et notamment à la mémoire épisodique. Ce lien entre hippocampe et mémoire épisodique a été mis en évidence grâce à des observations faisant suite à une ablation bilatérale de l'hippocampe ((Scoville and Milner, 1957) et voir revue (Bird and Burgess, 2008)) ou à des dommages partiels sur cette structure. La mémoire épisodique peut se définir comme un ensemble de souvenirs autoréférencés d'événements s'étant produits dans un contexte donné. En d'autres termes cela revient à répondre aux questions : quoi ? quand ? où ? La formation de la mémoire épisodique peut être étudiée chez le rongeur en utilisant par exemple la formation d'une mémoire de peur conditionnée à un indice ou à un contexte (Anagnostaras et al., 2001; Sanders et al., 2003). En plus de participer à la formation des épisodes, l'hippocampe permettrait de les organiser entre eux temporellement. Dans ces modèles animaux l'hippocampe est également impliqué dans la mémorisation et dans l'association entre plusieurs épisodes séquentiels (Fortin et al., 2002). La formation de souvenirs cohérents à partir de plusieurs expériences dépendrait également de l'activité neuronale séquentielle de l'hippocampe permettant une représentation conjointe du temps et de l'espace (voir revues (Eichenbaum, 2014, 2017)).

Pour combiner les fonctions cognitives de l'hippocampe dans la navigation spatiale et dans la mémoire épisodique, il a été plus récemment conceptualisé comme une structure qui génère intrinsèquement des activités neuronales séquentielles indépendamment de la nature de la représentation qu'elles pourraient supporter (pour revue voir par exemple (Buzsáki and Tingley, 2018)). Dans une revue György Buzsáki et Edvard Moser proposent que les mécanismes et circuits neuronaux utilisés dans la fonction mnésique de l'hippocampe sont une réutilisation des circuits déjà existant qui ont évolué de façon à permettre la navigation spatiale (Buzsáki and Moser, 2013). Plus en détails ils proposent dans cette revue deux parallèles : un entre la mémoire sémantique et la navigation allocentrique et un autre entre la mémoire épisodique (autoréférencée) et la navigation idiothétique. Ces auteurs appuient ce parallèle entre navigation autoréférencée et mémoire épisodique par le fait que les mécanismes neuronaux impliqués dans ces deux phénomènes seraient les mêmes. Dans ce cadre les auteurs définissent la mémoire épisodique comme un « voyage mental » dans le temps et l'espace dont l'agencement des différents épisodes serait supporté par les activités séquentielles de l'hippocampe. La mise en place de ces activités séquentielles au cours du développement postnatal en lien avec l'émergence de ces deux fonctions hippocampiques est une question encore ouverte. Le développement de ces patrons d'activités en lien avec la formation d'une représentation de l'espace commence à être décrit depuis peu ((Farooq and Dragoi, 2019; Muessig et al., 2019) et voir discussion ; partie 2.2). Dans le cadre présenté ci-dessus l'émergence de la capacité à former une représentation de l'espace autoréférencée devrait coïncider avec la formation de la mémoire épisodique (voir revue (Baram et al., 2019)).

La période développementale sur laquelle ce travail de thèse a porté précède les phases plus tardives marquées par l'exploration active de son environnement par l'animal. Comme cela sera introduit dans le chapitre 3 (Chapitre 3 ; partie 3.3) le comportement moteur lors du développement influe sur l'activité de l'hippocampe lors du développement précoce. Le rôle de l'activité lors du développement dans la mise en place anatomique et fonctionnelle des réseaux corticaux (Chapitre 3). Avant cela le chapitre suivant présentera le type d'activité observée dans la région CA1 de l'hippocampe au cours des deux premières semaines de vie.

CHAPITRE 2 : L'activité dans l'hippocampe en développement

2.1 L'activité du réseau hippocampique pendant les deux premières semaines postnatales

Dans cette partie nous décrivons les activités observées dans l'hippocampe lors du développement postnatal précoce. Dans un premier temps nous présenterons une séquence développementale issue de l'étude *in vitro* de l'activité hippocampique, dans un second temps nous présenterons les apports des études réalisées *in vivo*. Ceci a été développé dans une revue récente (Cossart and Khazipov, 2022).

A – L'apport des études *in vitro*

L'étude *in vitro* de l'activité du réseau hippocampique en période périnatale a permis de mettre en évidence une séquence développementale (Figure 2.1). Les premières activités observées pendant des stades embryonnaires (E16-E19) sont des activations neuronales sporadiques non corrélées entre différents neurones (Crépel et al., 2007). Ce type d'activité observé pour environ 20 % des neurones décroît progressivement jusqu'à la fin de la première semaine de vie postnatale. Ce type d'activité n'a pas été observé *in vivo*. A partir de la naissance apparaissent les activités de type plateaux d'assemblées synchrones (SPA). Cette activité observée dans une proportion de 20 % des cellules actives entre P0 et P2 se caractérise par des plateaux calciques d'environ 10 secondes se produisant à une fréquence de 0.02 Hz médiés par les jonctions gap (un type de jonction intercellulaire permettant la connexion des cytoplasmes de deux cellules permettant le passage de diverses molécules dont des ions) (Crépel et al., 2007). Ce type d'activité n'a pas non plus été observé *in vivo*. Les activités SPA diminuent progressivement après P2 au profit d'un patron d'activité appelé potentiels de dépolarisation géant (GDP). Ce type d'activité se caractérise au niveau d'un neurone par l'apparition spontanée d'un potentiel de dépolarisation géant (Ben-Ari et al., 1989). Les GDP sont observés à partir de P0 et peuvent être présents chez 80 % des cellules jusqu'à P8-10 puis disparaissent à la fin de la deuxième semaine de vie. Contrairement aux SPA les GDP sont dépendants de la transmission synaptique. Ils requièrent à la fois l'activation de récepteurs NMDA pour leur initiation, et sont médiés par le neurotransmetteur GABA. Ces événements sont générés de façon synchrone par une population de neurones (Ben-Ari et al., 1989). En conséquence, à l'échelle de la population de neurones, les GDP sont des événements recrutant de façon coordonnée une large proportion de neurones incluant cellules pyramidales et interneurones. Cette activité coordonnée de type GDP se produit à une fréquence comprise entre 0.1 Hz et 0.2 Hz chez la souris entre P6 et P10 (Crépel et al., 2007). Les GDP sont initialement décrits comme générés dans la région CA3 de l'hippocampe. Il a été montré dans l'hippocampe du lapin (De La Prida et al., 1998) et du rat (Bolea et al., 2006) qu'ils se propagent de la région CA3 vers CA1 et qu'ils peuvent également être générés dans CA1. L'existence de ce patron d'activité ou d'un équivalent *in vivo* n'est toujours pas clairement établie. Il a été proposé que le patron d'activité oscillatoire de type ondes aigües précoces (early sharp-waves ou eSW) qui sera présenté dans la partie suivante soit le pendant *in vivo* des GDP (Figure 2.2). Cette séquence développementale de l'activité observée dans l'hippocampe a été extensivement décrite dans une revue récente (Cossart and Khazipov, 2022). Ces activités corrélées récurrentes participeraient à la mise en place de la circuiterie intra-hippocampique de par son action sur la plasticité synaptique (Mohajerani et al., 2007).

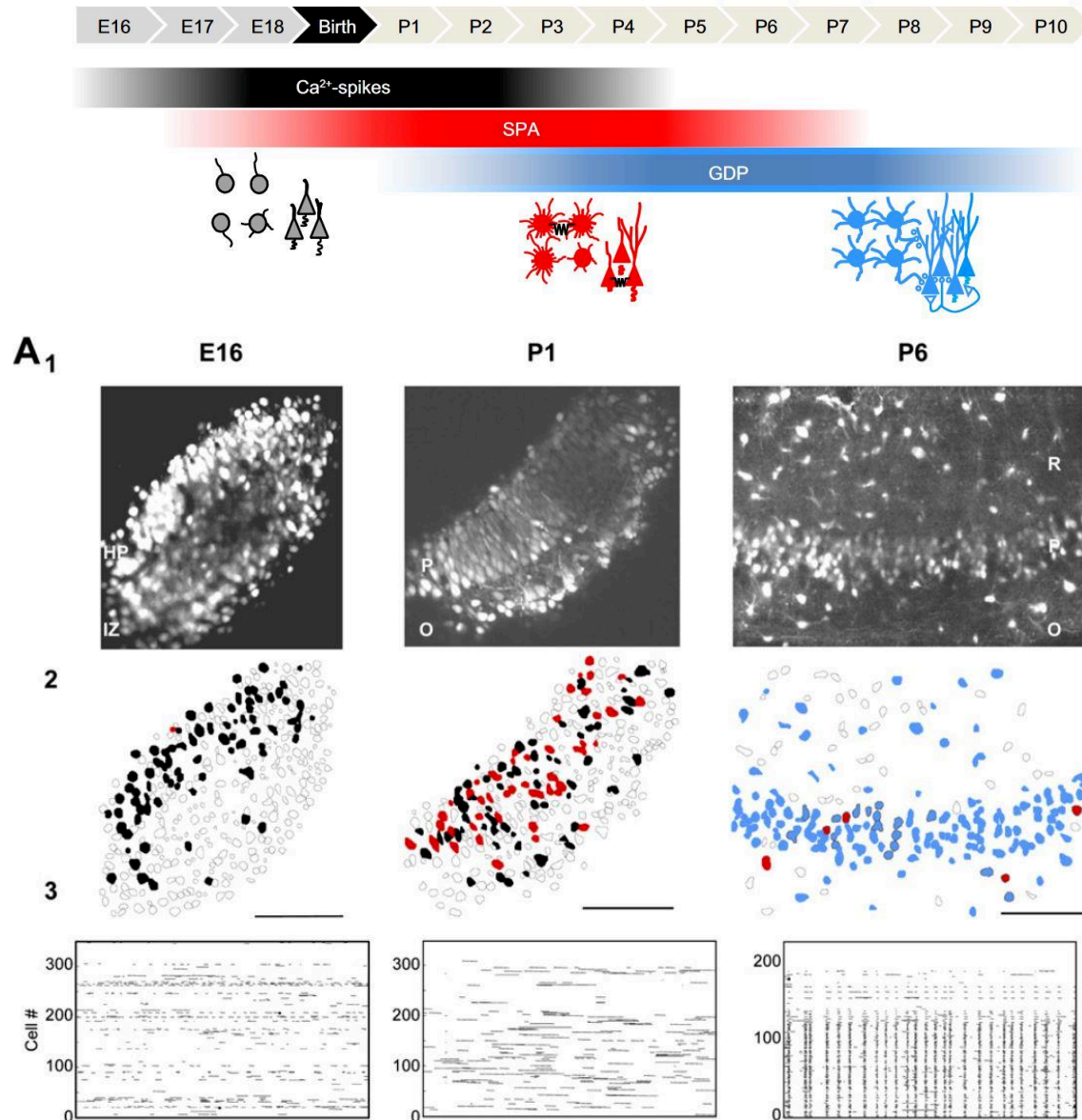


Figure 2.1 : Evolution de l'activité dans la région de CA1 telle que décrite *in vitro*.

Figure assemblée à partir de (Cossart and Khazipov, 2022; Crépel et al., 2007) représentant la séquence développementale décrite dans cette partie. En haut la succession des principaux patrons d'activités observés entre E16 et P10. **A1** : champ d'imagerie sur des tranches d'hippocampe à différents âges. **A2** : Représentations des contours des cellules détectées dans le champ d'imagerie. A tous les âges les contours non remplis correspondent aux neurones non actifs, les contours remplis en noir correspondent aux neurones présentant des 'calcium spikes', les contours remplis en rouge marquent les cellules présentant des SPA, les contours remplis en bleu identifient les cellules présentant des GDP. **A3** : Représentation de l'activité de l'ensemble des cellules imagées, sur ce graphique chaque ligne est une cellule, l'axe des abscisses représente le temps, on peut notamment très clairement voir les activités de type GDP à P6.

B – L'apport des études *in vivo*

La mise en place de l'imagerie *in vivo* dans la région de l'hippocampe lors du développement précoce présente des obstacles techniques limitant son utilisation. Il n'y a donc que peu ou pas d'études décrivant l'activité du réseau hippocampique lors du développement qui utilisent cette approche (Graf et al., 2021a, 2021b). La description de l'activité du réseau de neurones de l'hippocampe lors du développement postnatal précoce a principalement été décrite par des études utilisant des enregistrements électrophysiologiques. Comme évoqué précédemment les early sharp-waves (eSW) (Figure 2.2) ont été proposées comme étant le pendant *in vivo* des GDP (Leinekugel et al., 2002). Ces

activités de type eSWs observées chez le rat nouveau-né sont des événements récurrents dans la région CA1 de l'hippocampe. De façon similaire avec les sharp-waves (SW) observées dans l'hippocampe de la souris adulte, ce patron d'activité précoce se caractérise par une déflexion négative du potentiel de champ local au niveau du *stratum radiatum* (*sr*) et *lacunosum moleculare* (*slm*) avec une inversion du potentiel de champ local au niveau de la couche pyramidale. Sont associées à ces eSW une activation synaptique dans les deux couches *sr* et *slm* et une décharge de potentiels d'action par les cellules du *stratum pyramidale* (*sp*). Ces activations récurrentes se produisant à une fréquence d'environ 0.1 Hz synchronisant les neurones de l'hippocampe sont donc en un sens comparables aux GDP décrits *in vitro*, cependant cette comparaison est à relativiser.

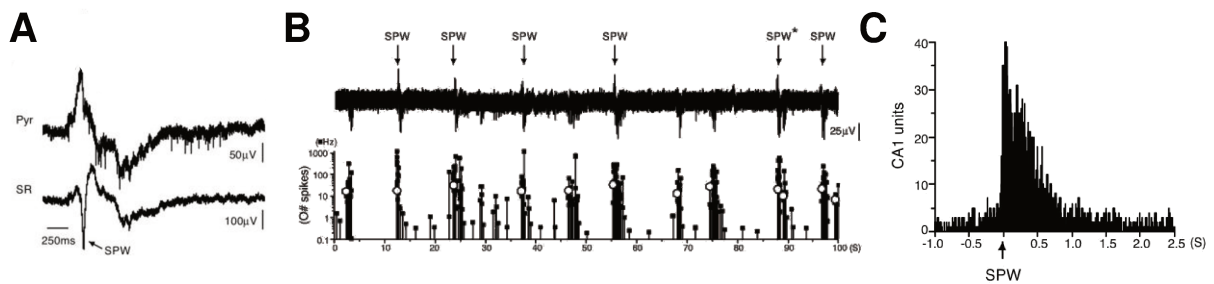


Figure 2.2 : Premières caractérisations électrophysiologiques des activités synchrones récurrentes observées dans la région CA1 de l'hippocampe lors du développement postnatal précoce.

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

Le profil du potentiel de champ local en fonction de la profondeur dans la région de CA1 montre que les eSWs sont associées à des entrées dépolarisantes dans les neurones de l'hippocampe au niveau du *sr* et de la *slm* (Valeeva et al., 2019). Au niveau du *sr* cela reflète l'activation des entrées de CA3 sur CA1 combinée à l'activation des entrées du cortex entorhinal par la voie perforante sur CA3 et le gyrus denté conduisant à l'activation de CA1 via la boucle trisynaptique. Au niveau de la *slm* cela reflète l'activation des entrées directes du cortex entorhinal via la voie temporoammonique et/ou l'activation d'autres structures projetant au niveau de la *slm* de CA1 telle que le noyau réunien. La mise en place de la connectivité entre CA3 et CA1 au niveau des synapses des collatérales de Schaffer étant plus tardive que celle du cortex entorhinal sur la *slm*, il est alors proposé que l'activité du cortex entorhinal conduise à la génération des eSWs dans CA1. Il est en effet montré que l'activation des neurones de la couche pyramidale de CA1 lors d'une eSW fait suite à l'activation des neurones des couches 2 (voie perforante) et 3 (voie temporoammonique) du cortex entorhinal avec un délai d'environ 50 ms. De plus, comme cela sera décrit plus en détails dans le chapitre suivant, l'activation du cortex entorhinal déclenchant les eSWs et l'activation des neurones de la couche pyramidale de CA1 dépend fortement du retour sensoriel associé aux mouvements spontanés du souriceau (Figure 2.3 – et voir Chapitre 3 ; partie 3.3.B). En opposition avec la génération locale à l'hippocampe et à CA3 des SWs dans l'hippocampe adulte, les eSWs observées dans la région de CA1 au cours du développement seraient déclenchées par une activation massive d'entrées extra-hippocampiques.

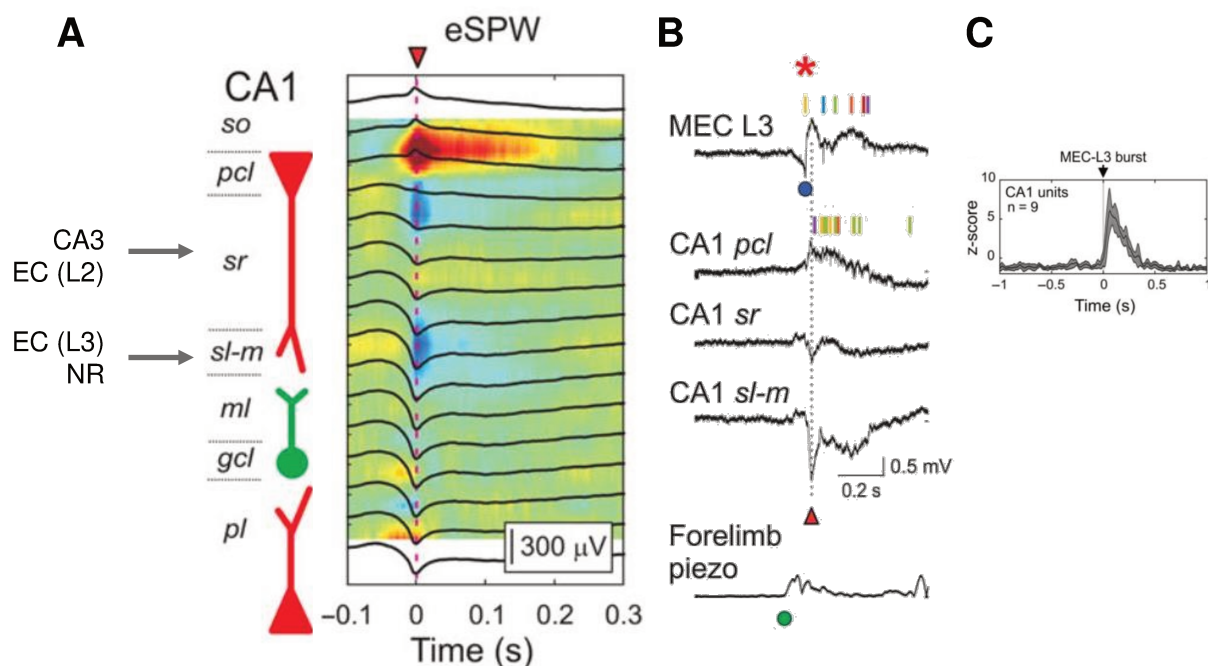


Figure 2.3 : Relation entre myoclonies du sommeil et activations successives du cortex entorhinal médian et de CA1 chez le souriceau.

Figure assemblée à partir de (Valeeva et al., 2019). **A** : densité de la source de courant autour d'une eSW montrant 2 puits de courant au niveau du sr et de la slm correspondant aux entrées de CA3, des couches 2 (EC L2, voie perforante) et 3 (EC L3 voie temporoammonique) du cortex entorhinal médian, et du noyau réunien (NR). **B** : LFP dans la couche 3 du cortex entorhinal médian et dans plusieurs couches de la région CA1 autour d'une eSW. Le dernier tracé représente le suivi du mouvement de l'animal, le rond vert marque un mouvement. Les rectangles de couleurs au-dessus des LFP de la couche pyramidale de CA1 (CA1 pcl) et de la couche 3 du cortex entorhinal médian (MEC L3) représente les potentiels d'action enregistrés. **C** : Nombre de potentiels d'action enregistrés dans la couche pyramidale de CA1 centré sur le début de la bouffée de potentiel d'action enregistrée dans la couche 3 du cortex entorhinal médian.

Comme le montre la persistance d'eSWs indépendantes du mouvement de l'animal suite à une décérébration prévenant le retour sensoriel (Karlsson et al., 2006), les résultats présentés précédemment n'exclut pas la possibilité d'une génération locale à l'hippocampe des eSWs. Cependant lien avec le mouvement et le rôle de déclencheur joué par le cortex entorhinal dans ces activations synchrones observées *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe lors de la première semaine de vie limitent la comparaison avec les GDP décrit *in vitro*. Le rôle des interneurons dans l'organisation des synchronisations neuronales associées aux eSWs n'est pas clairement établi. En effet bien qu'une manipulation de l'effet dépolarisant du GABA altère les GDP observés *in vitro* cela n'a que peu d'effet sur les eSWs *in vivo* chez des souris à P4 (Graf et al., 2021a). La réduction de l'excitabilité des interneurons à P3 est associée à une diminution de l'activité hippocampique, au contraire à P7 la réduction de l'excitabilité des interneurons est associée à une augmentation de l'activité de l'hippocampe (Murata and Colonnese, 2020).

Il est pensé que ces activités synchrones récurrentes observées dans l'hippocampe lors des deux premières semaines de vie participent à son développement anatomique et fonctionnel. Dans cette direction il a été montré que l'activité, entre P14 et P20, des cellules excitatrices du cortex entorhinal médian, plus précisément celles de la couche 2, participerait à la maturation des cellules de l'hippocampe (Donato et al., 2017). Une autre étude montre que l'inhibition chronique de ces mêmes cellules du cortex entorhinal médian entre P15 et P21 empêche le développement de l'innervation périssomatique des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe par les interneurons CCK. En se basant sur ces deux résultats ciblant la troisième semaine de vie, on peut proposer l'hypothèse selon laquelle les activités synchrones liées aux eSWs participeraient à la mise en place de la circuiterie hippocampique et notamment au développement des réseaux inhibiteurs locaux. Une section du chapitre suivant abordera plus en détails le développement de l'innervation périssomatique qui s'est révélée être un point

central des résultats qui seront présentés. Déjà évoquée en raison de leurs connexions réciproques avec les NGF dans la *slm* de CA1 (Chapitre 1 ; partie 1.1.C.b), les cellules de Cajal-Retzius participeraient au développement des connexions de l'hippocampe (Del Río et al., 1997) et également à la maturation anatomique des cellules pyramidales. En effet, une étude récente montre que l'ablation de ces cellules dans l'hippocampe est associée à un développement anormal des épines dendritiques des cellules pyramidales de CA1 (Glærum et al., 2022). Ces cellules de Cajal-Retzius font partie des cellules générées les plus tôt lors du développement cortical mais sont généralement éliminées par apoptose des circuits corticaux matures (Anstötz et al., 2018; Causeret et al., 2021; Cossart and Garel, 2022). Parmi les cellules générées tôt au cours du développement, certains interneurons sont fortement impliqués dans la génération et le contrôle de ces activités synchrones observées lors du développement de l'hippocampe. Cela sera brièvement décrit dans la section suivante.

2.2 Focus sur le rôle des interneurons hubs dans l'activité de CA1

Des travaux de l'équipe ont démontré qu'une sous population d'interneurons, appelés 'interneurons hub', jouait un rôle critique dans l'organisation des activités de réseau de type GDP observées *in vitro* dans l'hippocampe en fin de première semaine de vie (Bonifazi et al., 2009). Ces interneurons hub présentent plusieurs caractéristiques morpho-fonctionnelles : i) ils ont fréquemment une arborisation axonale se projetant à distance dans d'autres régions de l'hippocampe et en dehors, ii) ils ont une haute connectivité fonctionnelle, c'est-à-dire que leur activation précède l'activité des autres neurones et plus spécifiquement leur activation précède de façon récurrente les GDP, iii) ils ont une forte connectivité effective, c'est-à-dire que leur stimulation module significativement l'activité du réseau. Ce niveau de connectivité fonctionnelle et effective procure à ces interneurons hub une capacité à coordonner l'activité lors des GDP (Bonifazi et al., 2009). Cependant, la stimulation de ces interneurons a plus tendance à moduler la fréquence des GDP (à la hausse ou à la baisse) qu'à systématiquement en déclencher (Bocchio et al., 2020; Bonifazi et al., 2009). Ces interneurons hub se caractérisent également par la co-expression de plusieurs marqueurs neurochimiques tels que la somatostatine, les récepteurs M2 et mGluR1 α (Bocchio et al., 2020; Bonifazi et al., 2009; Picardo et al., 2011; Villette et al., 2016). En utilisant une approche permettant d'identifier les interneurons en fonction de leur lieu et âge de naissance au cours du développement embryonnaire (genetic fate mapping) il a été montré qu'une partie des interneurons hub est constituée par les interneurons générés les plus tôt (autour de E9) (Picardo et al., 2011).

La caractérisation de ces interneurons hub dans l'hippocampe *in vivo* ainsi que leur rôle potentiel dans l'organisation des activations synchrones associées aux eSWs lors du développement reste une question ouverte. En utilisant le genetic fate mapping la participation des interneurons générés tôt à l'activité *in vivo* de la région de CA1 a été analysée (Bocchio et al., 2020). Il ressort de cette étude que les interneurons générés tôt font partie des cellules les plus connectées fonctionnellement de CA1, elles sont significativement activées dans les événements calciques synchrones et préférentiellement recrutées dans des assemblées neuronales (Bocchio et al., 2020). Bien qu'ils n'aient pas été qualifiés d'interneurons hub, il se pourrait que ces derniers aient été identifiés *in vivo* récemment chez l'animal adulte dans une autre étude (Szabo et al., 2022). En effet, il a ici été mis en évidence qu'une sous population d'interneurons principalement localisée dans le *stratum oriens*, coexprimant SST et M2, recevant des entrées excitatrices de CA3, inhibitrices et cholinergiques du septum médian, ayant des projections à longues distances vers le subiculum, le cortex entorhinal et d'autres, est spécifiquement inactive lors des phases d'éveil actif de l'animal, ou lors du sommeil paradoxal, et active pendant les 'sharp wave ripples' lors de l'éveil calme ou du sommeil lent. Ces cellules nommées TORO (Theta-OFF/ Ripple-ON) pourraient donc être une sous population d'interneurons participant au contrôle de l'activité interne générée par l'hippocampe. Toutes ces caractéristiques laissent penser que ces interneurons TORO pourraient être des 'cellules hub'. Cette description chez l'animal adulte ouvre des portes à l'étude *in vivo* de ces cellules dans l'hippocampe en développement. L'étude du rôle des interneurons hub dans l'organisation de l'activité *in vivo* lors du développement sera introduit dans le chapitre suivant dans le cadre du cortex en baril.

Après ces deux chapitres introductifs centrés sur l'hippocampe, le prochain chapitre introduira de façon plus générale le cadre développemental dans lequel s'inscrit ce travail de thèse.

CHAPITRE 3 : Comment l'activité du développement précoce façonne les réseaux adultes

Le développement du système nerveux de la production d'un neurone jusqu'à son intégration dans un réseau fonctionnel en passant par la migration neuronale, la croissance axonale et dendritique et la formation de synapses est en partie contrôlé par des programmes génétiques régulant l'expression successive de facteurs de transcription, de facteurs de croissance, de molécules de guidage (voir (Rubenstein and Rakic, 2013)). Le développement d'un réseau de neurones est également dépendant de l'activité qu'il reçoit ou qu'il génère, dans cette partie nous discuterons de comment l'activité présente lors du développement précoce façonne le réseau adulte. Plus précisément nous tâcherons premièrement d'illustrer l'importance de l'activité sur le développement anatomique et fonctionnel des réseaux neuronaux. Dans un second temps nous présenterons des processus développementaux en lien avec la mise en place et la maturation des circuits inhibiteurs locaux notamment via le développement de l'innervation périssomatique inhibitrice. Enfin nous introduirons les 'twitches', un type de mouvement se produisant pendant le sommeil chez le souriceau, et présenterons le lien entre twitches et maturation des circuits neuronaux.

3.1 Participation de l'activité précoce au développement : exemples dans le cortex

Le but de cette première section est d'illustrer l'importance de l'activité lors du développement précoce sur la maturation anatomique et fonctionnelle des réseaux neuronaux (pour revue voir par exemple (Leighton and Lohmann, 2016)). Pour cela nous nous appuyons principalement sur deux structures pour lesquelles le rôle des activités précoces dans la formation d'un réseau mature a été amplement décrite : le cortex visuel et le cortex en barils. Ces deux sections ne se veulent en aucun cas une description exhaustive sur le développement de ces deux aires corticales.

A- Apport de l'étude du cortex visuel

Depuis les expériences devenues classiques de Hubel et Wiesel (Hubel and Wiesel, 1970) l'étude du cortex visuel a permis de mettre en évidence que l'activité neuronale liée à l'expérience visuelle participe à la mise en place des connexions et des fonctions observées chez l'animal adulte. Cette activité dépendante de l'expérience visuelle lors du développement participe notamment au raffinement de l'arborisation axonale des neurones du corps genouillé latéral se projetant dans la couche 4 du cortex visuel primaire ((Antonini and Stryker, 1993, 1996; Stryker and Harris, 1986) et voir revue (Katz and Shatz, 1996)). Cette activité expérience-dépendante est également impliquée dans la mise en place de la connectivité inter-couche (de la couche 4 vers la couche 2/3) (Callaway and Katz, 1992) et de la connectivité intra-couche au sein de la couche 2/3 (Callaway and Katz, 1991).

En plus de cette activité liée à l'expérience sensorielle, une forme d'activité spontanée indépendante de la vision participe également à la maturation du circuit visuel de la rétine au cortex visuel primaire (voir revue (Katz and Shatz, 1996)). Chez les mammifères avant l'ouverture des yeux et le début de la vision, cette activité provient de la décharge périodique spontanée de bouffées de potentiels d'action par les cellules ganglionnaires rétiniennes. L'activation corrélée entre cellules ganglionnaires rétiniennes voisines est à l'origine des vagues d'activités appelées vagues rétiniennes qui se propagent sur l'ensemble de la rétine et engendrent de l'activité dans le circuit visuel. Ces vagues rétiniennes participent au développement du système visuel (voir revue (Ackman and Crair, 2014; Feller and Kerschensteiner, 2020)). Elles permettent notamment la mise en place de la connectivité préférentielle entre une rétine et le corps genouillé latéral du côté contralatéral. Il a en effet été montré chez le furet que le blocage des vagues rétiniennes dans une rétine conduit à l'expansion des connexions entre la rétine active et la partie du corps genouillé latéral appartenant normalement à l'autre œil (Penn et al., 1998). Les vagues rétiniennes participeraient également à une première mise en place de la connectivité au sein de la couche 2/3 qui serait ensuite affinée de façon dépendante de l'expérience sensorielle (Callaway and Katz, 1991). Enfin il a été récemment montré que les vagues rétiniennes préparent le circuit visuel à la détection du mouvement en simulant les schémas de flux optique produits par un déplacement vers l'avant (Ge et al., 2021). Au-delà d'un rôle dans le raffinement de la connectivité au sein du système visuel cette dernière étude montre donc le rôle déterminant du patron d'activité spontanée pour la mise en place de la réponse visuelle. Elle montre qu'avant même le début

de l'expérience visuelle, les vagues rétiennes permettent la mise en place d'une réponse permettant l'intégration du flux optique associé au déplacement. L'activité spontanée présente lors du développement postnatal précoce permet donc au système visuel d'être en partie fonctionnel dès l'ouverture des yeux et l'apparition du comportement d'exploration active de son environnement par l'animal.

Dans l'ensemble ces études montrent l'implication de l'activité liée à l'expérience sensorielle et l'activité spontanée (précédent l'expérience) dans la maturation anatomique et fonctionnelle du système visuel de la rétine au cortex visuel.

B- Apport de l'étude du cortex en barils

Suite à la description des colonnes corticales au sein de la couche 4 du cortex en barils et l'association de chacune d'elles à une vibrisse spécifique de la souris (Woolsey and Van der Loos, 1970) le cortex en barils est devenu un modèle d'étude éminent pour l'étude du neurodéveloppement ou des mécanismes de plasticité neuronale (voir revue (Erzurumlu and Gaspar, 2020)). Cette partie illustrera premièrement l'importance de l'expérience sensorielle liée aux vibrisses et de l'activité au développement anatomique et fonctionnel du cortex en barils. Une seconde partie sera dédiée à la maturation dépendante de l'activité des interneurons et à leur participation à la mise en place de circuits fonctionnels.

Rapidement après l'identification des barils, l'hypothèse de la participation d'un signal en provenance des vibrisses participant à la formation des barils a été testée (Van der Loos and Woolsey, 1973). Cette étude pionnière montre que la cautérisation des vibrisses lors du développement précoce conduit à une malformation des colonnes corticales de la couche 4 du cortex en barils. La région des vibrisses est innervée via le nerf infra-orbital par les neurones du ganglion trigéminal dont les axones se projettent sur un noyau sensoriel du tronc cérébral relayant l'information jusqu'au noyau ventro-postéro-médian du thalamus qui contacte à son tour le cortex somatosensoriel primaire. Un deuxième circuit lié aux parois des barils implique un noyau différent du tronc cérébral, puis le noyau postéro-médian du thalamus avant de joindre le cortex en barils (voir revue (Sehara and Kawasaki, 2011)). Tout au long de ce circuit neuronal, des vibrisses jusqu'au cortex en barils, les structures présentent des organisations anatomiques liées à l'organisation des vibrisses. Ces organisations se mettent en place de façon séquentielle au cours de la période périnatale (E15 – P5) des structures périphériques vers les structures centrales (Sehara and Kawasaki, 2011). Cette mise en place séquentielle est dépendante de l'activité neuronale (voir revue (Erzurumlu and Gaspar, 2012)).

L'étude de l'activité neuronale en période postnatale précoce (P1-8) dans le cortex en barils grâce à l'enregistrement électrophysiologique *in vivo* montre une activité discontinue marquée par l'alternance entre des périodes de silence et des bouffées d'activités groupées dans un type d'oscillation précoce appelée 'spindle burst' (Khazipov and Luhmann, 2006; Khazipov et al., 2004). Ces 'spindle burst' sont des oscillations d'une durée de l'ordre d'une seconde se produisant environ toutes les 10 secondes. Plus précisément, ces oscillations consistent en une oscillation comprise entre 5 et 20 Hz souvent associée à une oscillation plus lente de l'ordre de 3 Hz. Les activations neuronales liées aux 'spindle burst' observées en électrophysiologie pourraient être le pendant des oscillations de réseau immature (ENO) décrite *in vitro* (Garaschuk et al., 2000) et *in vivo* (Adelsberger et al., 2005) dans le cortex en période néonatale. En effet, ces ENO ont une durée et une fréquence comparable avec les 'spindle burst'. Comme cela sera présenté ultérieurement la majorité des 'spindle burst' observée dans le cortex somatosensoriel est déclenchée suite à un mouvement de la souris lors du sommeil (Khazipov et al., 2004; Tiriach et al., 2012). Cependant, le lien entre le déclenchement des ENO et ces mouvements n'est pas clairement établi. Le deuxième patron d'activité éminent dans le cortex en barils en période néonatale est appelé oscillation gamma immature (EGO). Ce type d'activité oscillatoire se caractérise par une fréquence comprise entre 30 et 50 Hz pour une durée d'environ 200 millisecondes. Les EGO correspondent à une activation neuronale spatialement restreinte au sein d'une colonne corticale. EGO et 'spindle burst' co-existent dans le cortex en barils lors de la première semaine de vie, et ont en commun d'être précédés par une entrée excitatrice au niveau de la couche 4 caractéristique d'une activation d'origine thalamique (voir revue (Luhmann and Khazipov, 2018)).

L'activité neuronale associée aux EGO permettrait la potentialisation des connexions thalamo-corticales nécessaires à la mise en place de l'organisation spatiale de ces connexions (Minlebaev et al., 2011). Les EGO comme les 'spindle burst' permettraient également une synchronisation entre les cortex moteur primaire et somatosensoriel primaire contribuant au développement des connexions entre ces

deux régions corticales. Enfin, ces deux types d'activités seraient importantes dans la suppression de l'apoptose caractéristique de la première semaine de vie postnatale (voir revue (Luhmann and Khazipov, 2018; Luhmann et al., 2016)).

Jusqu'ici les mécanismes de maturation dépendante de l'activité décrits concernaient les cellules pyramidales. Cependant, comme ce paragraphe l'introduira, le développement des interneurons, leur intégration dans les circuits corticaux est également dépendant de l'activité. Une large littérature montre en effet que les étapes du développement des interneurons sont dépendantes de l'activité. C'est le cas de leur migration (voir par exemple (De Marco García et al., 2011)), de leur survie lors de l'apoptose développementale (voir par exemple (Wong et al., 2018)), de l'adaptation de leurs propriétés électrophysiologiques (voir par exemple (Dehorter et al., 2015)) ou encore de leur intégration dans les circuits corticaux (voir par exemple (De Marco García et al., 2015)). La participation de l'activité neuronale à ces différentes étapes du développement des interneurons est présentée de façon exhaustive dans une revue récente (Babij and De Marco Garcia, 2016).

En retour le développement des interneurons participe à la mise en place de la fonctionnalité des réseaux corticaux (voir revue (Ferrer and De Marco García, 2022)). Par exemple l'activation des interneurons de la couche 1 du cortex somatosensoriel en réponse aux activations thalamiques suite à une stimulation des vibrisses est nécessaire pour le raffinement des cartes sensorielles lors de la première semaine de vie postnatale (Che et al., 2018). Une étude de l'équipe s'est penchée sur l'évolution de l'activité coordonnée des interneurons du cortex en baril et son lien avec les entrées sensorielles au cours des deux premières semaines de vie postnatale (Modol et al., 2020). Elle met en évidence une transition développementale en début de deuxième semaine de vie postnatale marquée par un changement dans l'organisation des activités synchrones des interneurons supposés PV d'une organisation en petites assemblées fonctionnellement orthogonales et spatialement restreintes vers un réseau totalement connecté. Cette transition est également marquée par une période transitoire (P7-9) durant laquelle les assemblées GABAergiques passent d'une modulation positive à une modulation négative par la stimulation des vibrisses. Ainsi le développement des réseaux corticaux serait porté par la maturation des interneurons locaux (Cossart and Garel, 2022; Modol et al., 2020).

Cette même étude propose que les interneurons SST seraient à l'origine de la coordination des assemblées de neurones PV. En effet les interneurons SST sont co-activés préférentiellement lorsque plusieurs assemblées d'interneurons PV sont recrutées simultanément (Modol et al., 2020). Ceci est cohérent avec le rôle de hub démontré *in vitro* d'une partie des interneurons SST dans le cortex en développement (Modol et al., 2017). Ces interneurons hub ont été identifiés *in vivo* dans le cortex en baril (article en révision). Cette étude décrit le rôle des interneurons hub dans le contrôle de la synchronisation du réseau immature en lien avec la stimulation sensorielle. En combinant imagerie *in vivo* et stimulation lumineuse holographique de neurones uniques, cette étude montre le rôle des interneurons hub (incluant des interneurons SST) dans le l'intégration de l'information sensorielle par le cortex en baril en développement.

C - Synthèse

Ces deux exemples illustrent le fait que l'activité neuronale présente lors du développement, qu'elle soit évoquée par une stimulation sensorielle ou spontanée, participe à la mise en place anatomique et fonctionnelle des réseaux neuronaux corticaux. Une question est de savoir si ces activités neuronales lors du développement peuvent être permissives ou instructives (voir revues (Crair, 1999; Feller and Kerschensteiner, 2020)). Cela revient à demander si les patrons d'activités sont importants dans la mise en place et la maturation des connexions des circuits neuronaux (instructive) ou si la simple présence d'activité est suffisante de par le fait qu'elle permet à d'autres facteurs, tels que ceux impliqués dans la signalisation intracellulaire, de contrôler la bonne mise en place de la connectivité du réseau (permissive). De fait, il existe un continuum entre activité permissive et instructive selon la période développementale et le système neuronal en question. En effet, l'activité lors du développement peut être instructive (Ge et al., 2021; Stellwagen and Shatz, 2002; Xu et al., 2011) (voir également la revue (Feller and Kerschensteiner, 2020)) ou permissive de par le rôle de la signalisation calcique intracellulaire associée à l'activité neuronale dans la croissance et le guidage axonal (voir revue (Yamamoto and López-Bendito, 2012)).

A partir de là, il est légitime de se demander en quoi le développement anatomique et fonctionnel des circuits hippocampiques dépend également des activités présentes lors du développement précoce

décrites dans le chapitre précédent. Et si plus spécifiquement les patrons d'activités observés lors du développement de l'hippocampe sont importants pour l'émergence des schémas d'activités observés dans l'hippocampe adulte. En d'autres termes cela revient à demander s'il existe des patrons d'activités particuliers parmi les activités synchrones observées dans l'hippocampe au cours du développement, puis de chercher à savoir si ces patrons d'activités seraient déterminants dans la mise en place de la dynamique de l'activité décrite dans l'hippocampe adulte. Une contrainte liée à l'étude de l'hippocampe est son éloignement des entrées sensorielles. En effet, même si comme cela sera présenté dans le chapitre suivant l'hippocampe en développement répond au retour sensoriel lié au mouvement, l'hippocampe n'est pas une aire sensorielle ce qui, par rapport aux aires sensorielles primaires, complique la manipulation des entrées activatrices qu'il reçoit via la manipulation d'une modalité sensorielle.

En lien avec le rôle des interneurones dans la maturation des circuits corticaux illustré dans le cas du cortex en baril, un point clé dans le développement semble être la maturation des circuits inhibiteurs locaux qui fait l'objet de la partie suivante.

3.2 Emergence et maturation de l'innervation périssomatique inhibitrice

Chez la souris, dans plusieurs régions corticales, le développement de l'innervation GABAergique et de l'inhibition fonctionnelle est un processus qui s'étale au cours du développement postnatal et qui peut durer jusqu'à un stade équivalent à l'adolescence. De façon simple on peut distinguer trois grands types de synapses GABAergiques sur les neurones pyramidaux : i) les synapses axo-axoniques formant un contact au niveau du segment initial de l'axone d'une cellule pyramidale, ii) les synapses au niveau des dendrites distales de la cellule pyramidale, iii) les synapses périssomatiques provenant d'interneurones CCK ou PV se formant sur le corps cellulaire (De Felipe, 1997; Kawaguchi, 1997; Kubota et al., 2016). Dans cette partie nous nous intéresserons particulièrement au développement de l'innervation périssomatique qui est reporté comme un point charnière dans le développement de plusieurs régions corticales (Hensch, 2005) y compris, comme le suggère nos résultats, dans l'hippocampe.

A- Maturation de l'innervation périssomatique inhibitrice et période critique

Dans le cortex visuel du rat, le nombre de synapses GABAergiques périssomatiques sur les cellules pyramidales augmente entre P9 et P30 et particulièrement entre P9 et P15 (Miller, 1986). Ce développement anatomique est associé à l'augmentation des entrées inhibitrices sur les neurones pyramidaux (Morales et al., 2002). Cette période développementale marquée par l'émergence de l'innervation périssomatique inclut la période critique du développement du cortex visuel. En effet, cette période critique caractérisée par la forte dépendance de la maturation du cortex visuel aux expériences sensorielles (Hubel and Wiesel, 1970) est identifiée chez la souris entre P19 et P32 (Gordon and Stryker, 1996). Ce décours temporel simultané entre période critique et développement de l'inhibition locale permet de proposer que ce dernier déclenche cette période critique. Plusieurs études argumentant en ce sens ont été publiées (voir revue (Hensch, 2005)). En effet, une diminution de la transmission GABAergique entraîne un retard du début de la période critique, inversement une augmentation de la transmission GABAergique (Fagioli and Hensch, 2000; Iwai et al., 2003) ainsi qu'un développement précoce des interneurones entraîne (Huang et al., 1999) un avancement du début de cette période critique.

Dans le cortex en baril le développement de l'innervation périssomatique se déroule également au cours de la deuxième semaine de vie. En effet, entre P7 et P9 la préférence somatique des axones ciblant le soma est presque multipliée par trois. C'est-à-dire qu'il est trois fois plus probable qu'un axone formant une synapse sur un soma innerve de nouveau un soma à P9 qu'à P7. Après l'apparition de ce ciblage préférentiel, le nombre de synapses par soma est quasiment multiplié par dix entre P9 et P28 avec l'essentiel de l'augmentation se produisant entre P9 et P14 (Gour et al., 2021). Le développement du cortex en baril est marqué par la succession de plusieurs périodes critiques. Notamment entre P10 et P16 ou deux périodes critiques se succèdent, une première (P10-P14) pour la plasticité des connexions de la couche 4 vers les couches 2/3 (Maravall et al., 2004), et une deuxième (P13-P16) pour les connexions au sein de la couche 2/3 (Wen and Barth, 2011) (voir la revue (Erzurumlu and Gaspar, 2012)). Le développement de l'innervation périssomatique précède donc de peu ces périodes critiques et le début de l'exploration active de son environnement par le souriceau.

Il semblerait donc que dans ces deux régions corticales l'apparition de l'innervation périsomatique constitue un moment charnière au cours du développement permettant une transition entre une période développementale précoce caractérisée par une maturation dépendante de l'activité vers une seconde période développementale marquée par une maturation dépendante de l'expérience (voir revue (Cossart and Garel, 2022)).

Dans la région CA1 de l'hippocampe l'innervation périsomatique issue des interneurons CCK apparaît chez le rat à P8 puis se développe jusqu'à P20 (Morozov and Freund, 2003). Nos résultats montrent que l'apparition de l'innervation périsomatique provenant des interneurons PV dans la région CA1 de l'hippocampe se produit autour de P9 chez la souris. Nos résultats, présentés ultérieurement, laissent également penser que l'émergence de l'innervation périsomatique dans l'hippocampe participerait à une transition majeure dans l'activité du réseau de la région de CA1.

B- Une maturation de l'innervation périsomatique inhibitrice activité-dépendante

Le développement de l'innervation périsomatique inhibitrice dépend de l'expérience sensorielle ainsi que de l'activité. En effet le développement de l'innervation périsomatique peut être réduit par des déprivations sensorielles (Chattopadhyaya et al., 2004; Morales et al., 2002). Il est également dépendant de l'activité comme le montre l'accélération de la maturation de cette innervation dans le cortex visuel de souris surproduisant le facteur neurotrophique BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Huang et al., 1999). Dans la même direction, il a été montré que l'acide polysialique (PSA) participe à ce développement activité-dépendant de l'innervation périsomatique. En effet, cette molécule dont la concentration décroît, de façon dépendant de l'activité, fortement dans le cortex visuel entre P18 et P21, régule le développement de l'innervation périsomatique. Notamment une diminution prématurée de la concentration de PSA est associée à une maturation précoce de l'innervation périsomatique (Di Cristo et al., 2007). Cette maturation dépend aussi de la synthèse du neurotransmetteur GABA médié par l'enzyme GAD67 (Chattopadhyaya et al., 2007).

Dans l'hippocampe, il a été récemment montré que l'activité du cortex entorhinal entre P15 et P21 participe au développement expérience-dépendant de l'innervation périsomatique provenant des interneurons CCK sur les cellules granulaires du gyrus denté (Feng et al., 2021). Une de nos hypothèses est que le développement de l'innervation périsomatique des cellules CCK dans la région de CA1 dépend également de l'activité du cortex entorhinal, elle-même liée au mouvement de l'animal (cf. eSW) et au retour sensoriel que cela engendre (voir partie suivante). Il a été montré récemment que la maturation de l'innervation périsomatique provenant des interneurons PV dans plusieurs régions du néocortex telles que le cortex visuel ou le cortex préfrontal est en partie dépendante d'un effet paracrine des interneurons SST (Su et al., 2020). Nous avons émis l'hypothèse que le développement de l'innervation périsomatique issue des interneurons PV dans la région CA1 de l'hippocampe dépendrait de l'activité des interneurons SST.

3.3 Focus sur le rôle des “twitches” dans la maturation des circuits de neurones

Dans cette partie nous nous intéresserons au lien entre le comportement moteur du souriceau et le développement des circuits neuronaux. Chez le rat ou la souris juvénile les différents mouvements observés peuvent être catégorisés en trois groupes. Il y a des mouvements dit complexes, ce sont des mouvements volontaires associés à la phase d'éveil du souriceau, des mouvements brefs de type sursauts synchronisant l'ensemble des membres de l'animal (startles), ainsi que les twitches (un type de mouvement fortement présent lors du développement périnatal) qui font l'objet de la partie suivante. Pour cela nous aborderons brièvement le contexte d'apparition des twitches (pendant le sommeil actif / paradoxal) puis les circuits neuronaux générant ce type de mouvement, et les activations neuronales qui en découlent. Enfin, en s'appuyant notamment sur la section précédente, nous pourrions lier twitches et maturation des réseaux neuronaux.

A – Que sont les “twitches” : définition

Chez plusieurs mammifères tels que le rat, le cochon d'inde, le chat mais aussi l'humain, la période périnatale est marquée par la forte prévalence des phases de sommeil (Gramsbergen et al., 1970; Jouvett-Mounier et al., 1969; Roffwarg et al., 1966). En particulier chez le rat juvénile la phase de sommeil peut représenter jusqu'à 80 % du cycle veille-sommeil. Une seconde caractéristique de cette période développementale est que la phase de sommeil est dominée par le sommeil paradoxal (PS), aussi appelé

sommeil actif. Bien que les termes sommeil actif et sommeil paradoxal sont fréquemment utilisés de façon interchangeable, des différences subsistent. Le sommeil paradoxal est défini de façon complète chez l'animal adulte. Il s'agit d'un état comportemental caractérisé, entre autres, par plusieurs composantes telle que l'atonie musculaire, une activité corticale élevée comparable à celle de l'état d'éveil, la présence d'une oscillation thêta dans l'hippocampe. Les circuits neuronaux supportant la mise en place du sommeil paradoxal, de ces caractéristiques ainsi que de ces fonctions biologiques sont discutés dans plusieurs revues (Peever and Fuller, 2017; Vertes, 1984). Cependant toutes ces composantes du sommeil paradoxal adulte ne sont pas observées lors des premiers jours du développement postnatal (P0 - P8) au cours desquels seuls l'atonie musculaire et les twitches sont présents, c'est pourquoi le terme de sommeil actif peut alors être utilisé (Figure 3.1 A, (Blumberg et al., 2020)). Il y a aujourd'hui un consensus sur la présence de sommeil paradoxal, même si sa définition peut différer partiellement, chez les mammifères, oiseaux et quelques reptiles (Blumberg et al., 2020). Chez le rat lors de la première semaine de vie postnatale cette phase particulière du sommeil peut représenter jusqu'à 100 % de la phase de sommeil (Figure 3.1 B) (Jouvet-Mounier et al., 1969). La proportion de sommeil paradoxal atteint un pic autour du 7^{ème} jour chez le rat avant de décroître progressivement au profit du sommeil lent (SWS). La phase de sommeil lent (SWS), aussi appelé sommeil calme, est très rare et se caractérise par des épisodes très court chez le rat lors de la première semaine de vie. Il n'apparaît qu'entre P10 et P12 chez le rat juvénile puis augmente rapidement en proportion jusqu'à environ 30 jours pour atteindre une répartition du cycle veille sommeil identique à celle décrite chez le rat adulte.

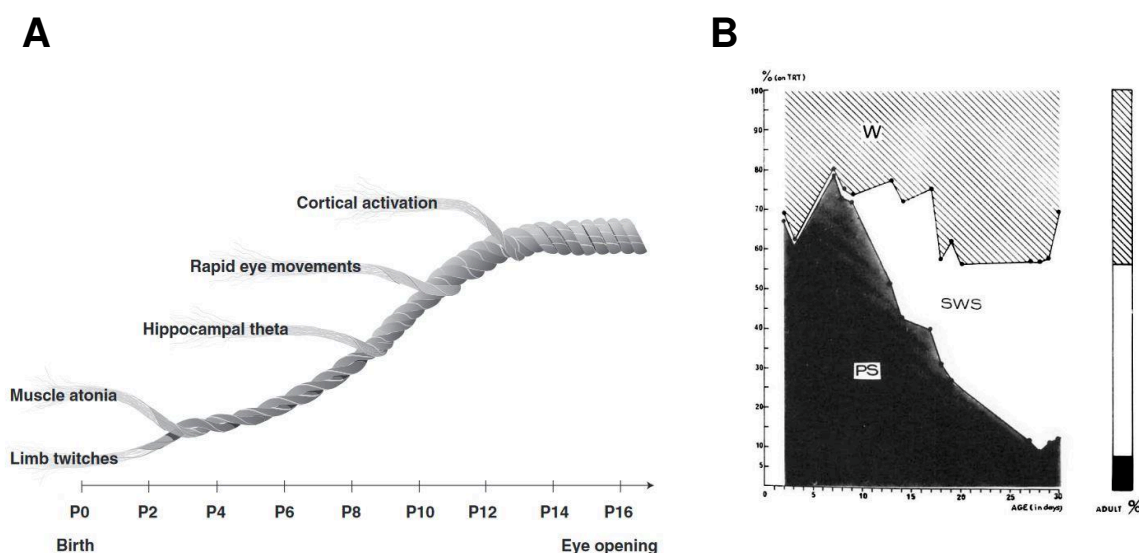
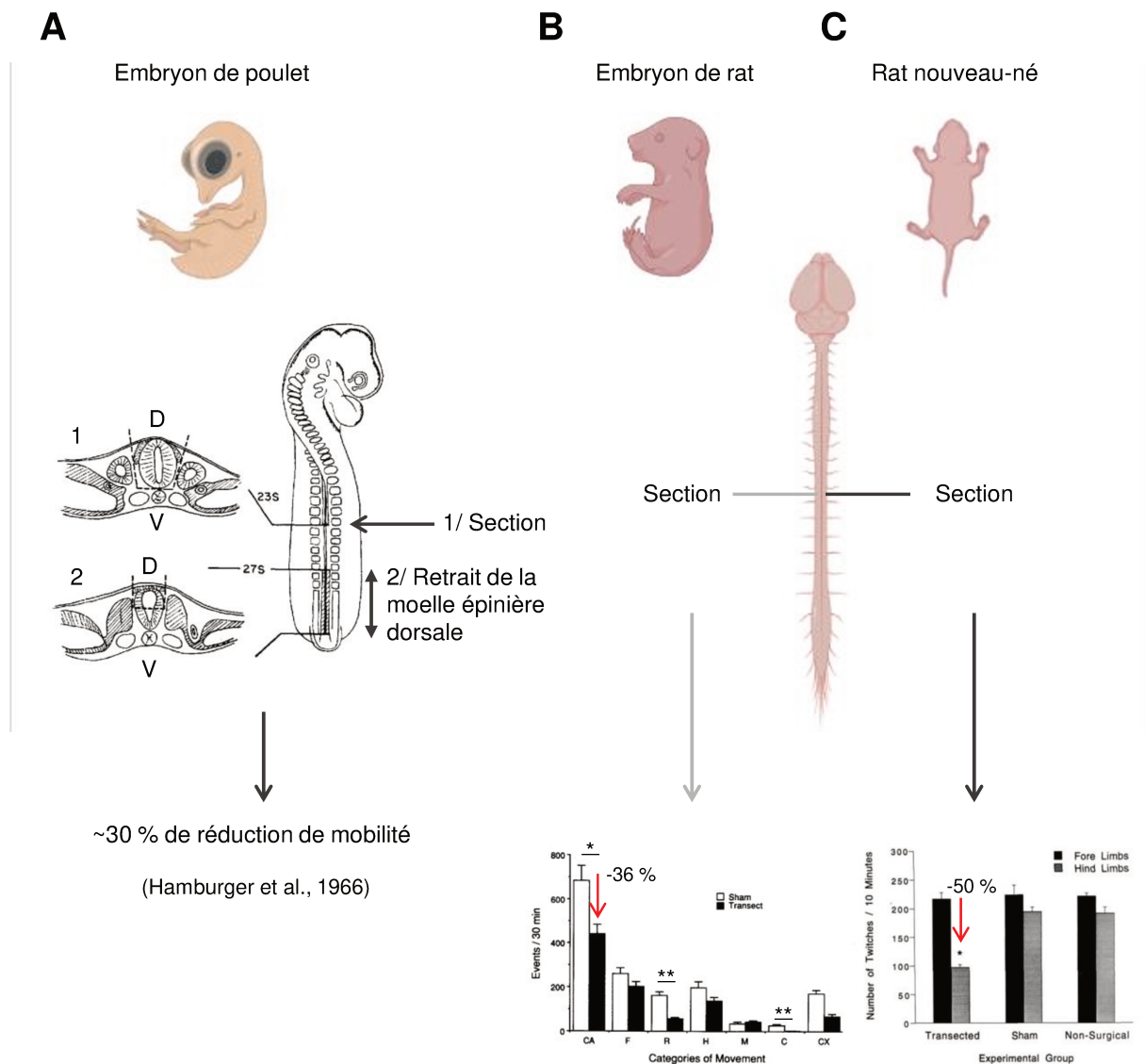


Figure 3.1 : Composantes et évolution de la quantité de sommeil paradoxal chez le rongeur juvénile.

A. Extraite de (Blumberg et al., 2020) adaptée de (Corner, 1985). La corde tressée représente l'assemblage progressif au cours du développement des différentes composantes qui caractérisent le sommeil paradoxal tel qu'il est décrit chez l'animal adulte. **B.** Extraite de (Jouvet-Mounier et al., 1969). Changements, au cours d'enregistrements de 8 heures, des pourcentages moyens d'éveil (W), de sommeil lent (SWS) ("sommeil calme" pendant les 12 premiers jours) et de sommeil paradoxal (PS) exprimés en fonction de l'âge chez le rat. En ordonnée : pourcentage du temps total d'enregistrement (TRT). En abscisse : âge en jours. $N = 48$; nombre d'animaux = 18. La colonne de droite montre les pourcentages de W, SWS et PS sur 24 heures chez le rat adulte.

Le sommeil paradoxal (PS sur la figure) est aussi appelé sommeil actif en raison de la présence de 'twitches' lors de cette phase particulière du sommeil. Les twitches sont des mouvements intermittents, se produisant de façon spontanée (c'est-à-dire ne nécessitant pas de stimulation sensorielle) et contrastant avec l'atonie musculaire observée lors du sommeil actif, en cela ils correspondent aux mouvements de Hamburger de type I (Hamburger, 1973). Ces twitches lors du sommeil actif sont observés chez plusieurs espèces telles que le rat, le cochon d'inde, le chat (Jouvet-Mounier et al., 1969) mais aussi de façon plus générale chez les mammifères terrestres (Blumberg et al., 2020). Chez le rat ils sont plus intenses et fréquents chez le juvénile jusqu'à P10-12 (Jouvet-Mounier et al., 1969).

Les mécanismes neuronaux à l'origine de la génération des twitches sont présentés dans la revue de (Blumberg and Lucas, 1996). Dans ce paragraphe nous revenons brièvement sur quelques faits principaux. Ces mécanismes ont d'abord été étudiés par des embryologistes (Figure 3.2). Il a été montré chez l'embryon de poulet que malgré une section medio-thoracique de la moelle épinière combinée avec le retrait chirurgical de la moitié dorsale et sensorielle de la moelle épinière lombosacrée les embryons présentaient toujours des twitches au niveau des membres inférieurs (Hamburger et al., 1966). Cela démontrait donc que les twitches pouvaient être générés par de l'activité spontanée générée de façon locale au niveau de la moelle épinière, c'est-à-dire en l'absence d'ordre descendant du cerveau et de manière non réflexogénique. Ces constatations ont été étendues à l'embryon de rat chez qui des mouvements des membres inférieurs sont observés suite à une section de la moelle épinière à hauteur de région médio-thoracique (entre T2 et T5) (Robertson and Smotherman, 1990). Ces observations faites sur l'embryon de rat ont également été étendues au rat nouveau-né. En effet, suite à une section de la moelle épinière, toujours au niveau de la région médio-thoracique, lors du premier ou deuxième jour de vie post-natale, une diminution de 50 % seulement du nombre de twitches des membres inférieurs est observés lors du 5^{ème} jour de vie (Blumberg and Lucas, 1994). Dans cette étude les auteurs s'intéressent également à l'organisation temporelle des twitches chez les animaux ayant subi la transsection. Ils montrent que les twitches produits à haute fréquence (ceux séparés par des intervalles compris entre 0 et 3 secondes) sont spécifiquement réduits, alors que ceux produits à plus basse fréquence (avec des intervalles compris entre 3 et 10 secondes) ne le sont pas (Blumberg and Lucas, 1994). De cette observation, ils proposent l'existence de deux mécanismes indépendants de génération des twitches chez le rat nouveau-né : un premier localisé au niveau de la moelle épinière générant des twitches sur une large gamme de fréquence, et un second générant des twitches à haute fréquence que les auteurs proposent d'être localisé au niveau du tronc cérébral (Blumberg and Lucas, 1996). En effet, la partie caudal du noyau du pont (Caudal pontine reticular nucleus) ainsi que le noyau à cellules géantes (Gigantocellular reticular nucleus) localisés dans le tronc cérébral, respectivement dans le pons et la medulla, contiennent des neurones présentant une activité de décharge en bouffée coïncidant avec les twitches observés lors du sommeil paradoxal (Vertes, 1984). La participation de la partie caudal du noyau du pont dans la génération des twitches associée au sommeil actif a également été mise en évidence chez le rat âgé d'une semaine (Kreider and Blumberg, 2000). Enfin, un troisième noyau : le noyau rouge (Red nucleus) localisé dans le mésencéphale participe également à la génération des twitches, son inhibition entraînant une diminution de leur fréquence (Rio-Bermudez et al., 2015). La génération des twitches principalement dominée par la moelle épinière lors des stades fœtaux devient progressivement dominée par les mécanismes de production localisés dans le tronc cérébral lors des stades néonataux. Même si la génération des twitches reste principalement liée à la moelle épinière et au tronc cérébral, une partie d'entre eux pourrait être générée par l'activation du cortex moteur primaire. En effet, il a été montré qu'un tiers environ des twitches est précédé par une activation du cortex moteur primaire, et qu'une application locale de lidocaïne en surface du cortex moteur, entraînant son inactivation, conduit à une réduction d'environ 30 % du nombre de twitches (An et al., 2014).



(Robertson and Smotherman, 1990) (Blumberg and Lucas, 1994)

Figure 3.2 : Représentation schématique des protocoles expérimentaux permettant la mise en évidence d'une génération des myoclonies du sommeil au niveau de la moelle épinière.

A : Adaptée de (Hamburger et al., 1966) représentant le protocole chirurgical combinant une section de la moelle épinière médio-thoracique avec un retrait de la partie dorsale (sensorielle) de la moelle épinière lombo-sacrée. **B :** Adaptée de (Robertson and Smotherman, 1990) représentant une section de la moelle épinière entre les vertèbres T2 et T5 (médio-thoracique) sur l'embryon de rat conduisant à une réduction de mobilité (CA) spécifiquement au niveau des pattes arrières (R) et des mouvements de torsion (C). **C :** Adaptée de (Blumberg and Lucas, 1994) représentant une section médio-thoracique de la moelle épinière ainsi que la réduction de 50 % du nombre de twitches observés au niveau des pattes arrières.

Comme évoqué dans une première définition, les twitches sont des mouvements correspondant au mouvement de Hamburger de type I. Selon cette définition ils sont intermittents et spontanés. En plus de ces deux caractéristiques, les twitches sont initialement présentés comme des mouvements non coordonnés des différentes parties du corps (voir revue (Hamburger, 1973)). Cependant dans cette même revue, l'auteur admet qu'une analyse précise des séquences de twitches en utilisant des vidéos ralenties serait désirable (Hamburger, 1973). Plus tard, la présence d'une structuration temporelle des twitches des différents membres a été décrite chez le rat juvénile avec en particulier une probabilité constante de voir un membre bouger tant que les quatre n'ont pas bougé puis une chute rapide de cette probabilité (Robinson et al., 2000). En utilisant des enregistrements vidéo à haute vitesse (250 images / seconde) une étude plus récente a permis de décrire plus précisément la structure temporelle des twitches ainsi

que de montrer que cette organisation est modifiée lors de la première semaine de vie postnatale chez le rat (Blumberg et al., 2013a).

Jusque-là nous avons brièvement défini les twitches, en exposant leur lien avec le sommeil paradoxal, les mécanismes permettant leur génération ainsi que leur organisation temporelle. Pour résumer, ils sont donc des mouvements spontanés des membres se produisant lors du sommeil paradoxal et initiés par une activité neuronale spontanée au niveau du tronc cérébral ou localement au niveau de la moelle épinière. De plus, ces twitches génèrent un retour sensoriel à l'origine d'une activation neuronale dans la moelle épinière, puis dans les régions sous-corticales et corticales (Figure 3.3). Plus précisément, le retour sensoriel lié aux twitches active en premier lieu les neurones sensoriels de la corne dorsale de la moelle épinière (Inácio et al., 2016) et remonte jusqu'au noyau cunéiforme externe (External cuneate nucleus) localisé dans le tronc cérébral (Tiriac and Blumberg, 2016). Au niveau de ce noyau l'intégration du retour sensoriel semble être, pour des raisons non connues, dépendant de l'état de vigilance du souriceau (Dooley et al., 2019). En effet, lors d'une phase d'éveil, avant P12, le retour sensoriel associé à un mouvement est inhibé, au niveau du noyau cunéiforme externe, par la copie efférente de la commande motrice à l'origine du mouvement. Cette inhibition serait absente lors du sommeil paradoxal (Dooley and Blumberg, 2018; Tiriac and Blumberg, 2016). Cela permettrait donc au retour sensoriel lié aux twitches de remonter sur les noyaux thalamiques. Dans ce modèle, le retour sensoriel provoqué par un twitch généré de façon locale dans la moelle épinière (sans copie efférente d'une commande motrice) passerait également le barrage du noyau cunéiforme externe et parviendrait aux noyaux thalamiques. Depuis le thalamus ces réafférences sensorielles atteignent les régions du cortex somato-sensoriel et motrices primaires. Enfin ce retour sensoriel peut atteindre l'hippocampe depuis ces régions via un relai par le cortex entorhinal (Del Rio-Bermudez et al., 2020; Dooley and Blumberg, 2018; Mohns and Blumberg, 2010; Valeeva et al., 2019).

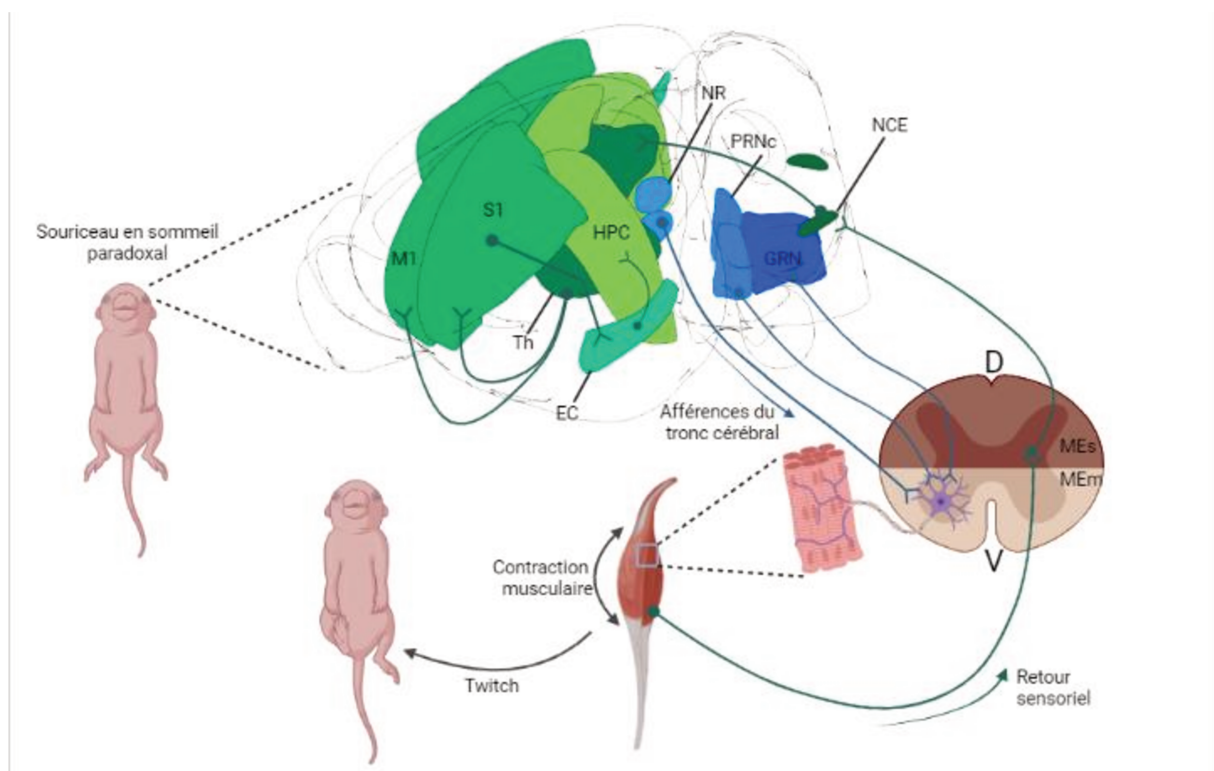


Figure 3.3 : Représentation schématique des mécanismes à l'origine de la production des twitches et voies neuronales du retour sensoriel.

Accronymes : D : Dorsal, V : Ventral, Mes : Moelle épinière sensorielle, Mem : Moelle épinière motrice, NCE : Noyau cunéiforme externe (external cuneate nucleus), GRN : Gigantocellular reticular nucleus, PRNc : Pontine reticular nucleus caudal part, NR : Noyau rouge, Th : Thalamus, M1 : Primary motor area, S1 : Primary somatosensory area, EC : Cortex Entorhinal, HPC : Hippocampe. Lors du sommeil actif (paradoxal) chez le souriceau l'activation spontanée des neurones moteurs de la moelle épinière (lors des phases développementales très précoces) ou de neurones du tronc cérébral (phase un peu plus tardive du développement) conduit à une

contraction musculaire produisant un twitch au niveau d'une extrémité. Le retour sensoriel lié à cette contraction musculaire produit une activation neuronale en chaîne de la moelle épinière jusqu'au cortex cérébral.

Étant donné la prévalence du sommeil et notamment du sommeil paradoxal lors des deux premières semaines de vie chez le rat ou la souris, des milliers de twitches sont produits chaque jour chez la souris juvénile. En conséquence, il est très probable que l'activité engendrée suite à ces twitches participe à la maturation des régions sous corticales et corticales recevant les réafférences sensorielles liées aux twitches. Ce point sera discuté dans les parties suivantes.

B – Twitches et maturation de la moelle épinière et du cortex moteur

Le retour sensoriel lié aux twitches atteint en premier lieu la partie dorsale de la moelle épinière où il entraîne l'activation des neurones sensoriels, et est déterminant dans la coordination des neurones moteurs et sensoriels de la moelle épinière (Inácio et al., 2016). Cette activation de neurones moteurs de la moelle épinière suivi par l'activation des neurones sensoriels participeraient notamment à l'adaptation fonctionnelle du système de retrait réflexe et au développement du réflexe de retrait nociceptif (Petersson et al., 2003; Schouenborg, 2008) et pourrait participer au développement du circuit du réflexe myotatique (Chen et al., 2003). Au niveau du cortex moteur primaire le retour sensoriel lié aux twitches est suivi d'une augmentation significative de l'activité des neurones avec un délai d'environ 100-125 millisecondes, ainsi que par deux patrons d'activités oscillatoires les « spindle burst » (Khazipov and Milh, 2018; McVea et al., 2012; Tiriack et al., 2014) et les oscillations gamma précoces dans (An et al., 2014). Il est fort probable que tout comme dans d'autres régions corticales (cf Chapitre 3 partie 1) ces patrons d'activités précoces participent à plusieurs processus développementaux tels que la neurogenèse, le contrôle de l'apoptose, la migration neuronale, et d'autres (Yang et al., 2016; Kilb et al., 2011). Plus spécifiquement au niveau du cortex moteur primaire ces activations lors du développement précoce participeraient notamment à l'affinement de ses champs récepteurs (ségrégation des populations de neurones répondant au même stimulus en conséquence de l'activation des neurones seulement pour leur stimulus préféré), et sa transition de « sensoriel » vers « moteur » (Dooley and Blumberg, 2018). Cette même étude décrit cette transition comme rapide entre P11 et P12, et montre qu'elle est médiée par l'émergence d'un réseau inhibiteur local sans adresser la contribution de plusieurs types d'interneurones.

C – Twitches et maturation de l'axe thalamo-cortical

Après un relai thalamique, les réafférences sensorielles parviennent au cortex somatosensoriel primaire. Comme le montre la présence d'oscillation de type « spindle burst » dans la partie du cortex somatosensoriel répondant au mouvement des membres inférieurs malgré une section de la moelle épinière en région thoracique, ces patrons d'oscillations peuvent être générés de façon intrinsèque au cortex (Khazipov et al., 2004). Cependant, la majorité d'entre elles reste déclenchée par le retour sensoriel provoqué par les twitches (Khazipov et al., 2004). L'influence de ces patrons activités précoces dans la maturation du cortex a déjà été présenté, il apparaît donc évident que les twitches en tant que déclencheurs sont importants dans la maturation de l'axe thalamo-cortical lors des phases du développement précoce.

Les mouvements de type twitches peuvent également se produire au niveau des muscles contrôlant le mouvement des vibrisses. Dans ce cas ils génèrent également un retour sensoriel qui parvient au noyau postéro-médian ventral (ventral posteromedial nucleus) du thalamus avec un délai compris entre 100 et 250 millisecondes. Cette activation thalamique est suivie d'une activation du cortex somatosensoriel primaire (Tiriack et al., 2012). Les twitches au niveau des vibrisses participeraient donc également à la maturation des circuits thalamo-corticaux.

D – Twitches et maturation du circuit hippocampo-entorhinal

Suite à l'activation du cortex somatosensoriel le retour sensoriel lié aux twitches entraîne les activations successives du cortex entorhinal et de l'hippocampe (Mohns and Blumberg, 2008, 2010; Valeeva et al., 2019). Bien que le lien causal entre l'activation du cortex entorhinal et de l'hippocampe ne soit pas complètement établi, l'ensemble de ces études le suggère très fortement. Nous avons tenté d'étudier cette causalité en combinant imagerie calcique *in vivo* et inhibition chimio-génétique du cortex entorhinal chez le souriceau éveillé, cela sera présenté dans la partie résultats (Leprince et al., 2022).

Une étude récente a montré que l'inhibition de l'activité du cortex entorhinal entre P15 et P21 réduit l'innervation périssomatique inhibitrice des interneurons CCK dans le gyrus denté (Feng et al., 2021). Il est donc également possible que l'activité du cortex entorhinal, fortement déclenchée par les twitches lors du développement postnatal, participe également à la maturation anatomo-fonctionnelle de l'hippocampe. Le rôle exact des twitches dans la maturation de l'hippocampe reste non décrit. En lien avec le rôle préparatoire que l'activité peut avoir au cours du développement (voir vagues rétinienne dans le cortex visuel), il n'est pas connu si l'activité liée au twitches permet de préparer le réseau de CA1 à la formation des patrons d'activités séquentiels observés chez l'animal adulte.

CHAPITRE 4 : Objectifs du travail de la thèse présentée

4.1 Origine et évolution

Originellement, ce projet de thèse se base sur des travaux réalisés dans l'équipe décrivant l'organisation séquentielle « par défaut » observée dans la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe lorsqu'une souris se déplace sur un tapis roulant non motorisé dans un environnement où la présence d'indices sensoriels est minimisée (Villette et al., 2015). Il est montré dans cette étude soutenue par une publication ultérieure que les séquences décrites sont le support d'un codage mixte du temps et de la distance (Haimerl et al., 2019). Le projet s'appuie fortement sur les travaux de l'équipe décrivant des assemblées de neurones hippocampiques et leur relation avec l'activité séquentielle (Malvache et al., 2016). Dans cette étude, les assemblées de neurones hippocampiques, sont décrites comme de petits groupes orthogonaux de neurones. Ces groupes sont qualifiés d'orthogonaux au sens où un neurone n'appartient qu'à une seule assemblée et au sens mathématique où l'ensemble des assemblées constitue une base sur laquelle se décompose l'activité neuronale séquentielle observée pendant la course de la souris. Une séquence neuronale observée pendant la course de la souris est alors décrite comme une combinaison d'assemblées activée de façon successive. De façon intéressante, certaines assemblées ne semblent pas être recrutées dans l'activation séquentielle lors de la course. De ces résultats émerge l'hypothèse que les assemblées décrites comme telles constituent une unité de base de l'activité de réseau de la région CA1 de l'hippocampe. Dans le cadre de cette hypothèse se pose la question de la préexistence des assemblées par rapport aux séquences. L'objectif initial de mon travail de thèse était donc d'utiliser de l'imagerie calcique *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe chez le souriceau non anesthésié dans le but d'étudier l'apparition des assemblées neuronales, de l'activité séquentielle ainsi que la relation entre les deux. Nos premières observations suggéraient l'absence d'assemblées et/ou séquences lors du développement postnatal précoce. En revanche nous avons observé une évolution rapide de l'activité de CA1 lors des deux premières semaines de vie. Nous avons donc rapidement réorienté les objectifs vers les 5 décrits dans les points suivants.

4.2 Présentation des objectifs

Premier objectif : Décrire l'activité de réseau précoce dans la région CA1 de l'hippocampe

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à décrire l'activité de réseau dans la région CA1 de l'hippocampe lors des deux premières semaines de vie postnatale chez la souris. Cela permettait d'enrichir les connaissances sur la dynamique du réseau hippocampique en développement obtenues grâce à l'approche d'électrophysiologie extracellulaire évoquée dans l'introduction.

Second objectif : Lier l'activité décrite au comportement moteur spontané du souriceau

Comme évoqué dans l'introduction, le comportement moteur spontané du souriceau a été décrit comme un facteur influant sur l'activité hippocampique lors des phases précoces du développement. Nous avons donc cherché à lier l'activité que nous avons décrite en imagerie avec les mouvements observés du souriceau.

Troisième objectif : Décrire les contributions des cellules pyramidales et interneurones à l'activité du réseau

Un troisième objectif était de tirer parti d'un avantage que procure l'approche d'imagerie calcique *in vivo*, à savoir la résolution spatiale. En effet combinée à l'utilisation de lignées de souris transgéniques, il est possible grâce à l'imagerie calcique d'enregistrer simultanément l'activité de population de neurones définie génétiquement, ici les cellules pyramidales et les interneurones. En plus de cette approche fonctionnelle, une approche anatomique basée sur du traçage rétrograde a été envisagée et tentée.

Quatrième objectif : Etudier le rôle de l'activité précoce sur la maturation du réseau hippocampique

Enfin le dernier objectif était d'étudier comment les activités précoces que nous observons dans l'hippocampe participeraient à la maturation de ce réseau et à l'émergence des fonctions qu'il remplit chez la souris adulte. Pour répondre à cet objectif au moins deux approches s'offrent à nous : l'imagerie

calcique longitudinale et une approche visant à perturber l'activité précoce pour la lier à des répercussions potentiellement observées à des stades développementaux plus tardifs.

L'imagerie calcique *in vivo* réalisée de façon longitudinale a l'avantage de permettre de suivre l'activité à l'échelle du neurone unique sur plusieurs jours, et donc de mettre en relation l'activité observée lors de phases précoces du développement avec celle observée à des stades plus tardifs, voire même celle observée chez la souris adulte. Les contraintes liées à cette approche sont évoquées dans les méthodes et les alternatives sont évoquées dans la partie discussion.

L'approche visant à modifier l'activité lors du développement précoce requiert de disposer à la fois d'un moyen de manipuler l'activité du réseau de l'hippocampe lors du développement précoce, et d'un ou plusieurs paramètres quantifiables permettant d'évaluer les conséquences de la manipulation effectuée. Pour manipuler l'activité lors du développement précoce plusieurs approches ont été considérées telle la restriction des « twitches », l'inhibition chronique d'une catégorie des interneurons SST ou l'inhibition chronique du cortex entorhinal. Afin d'évaluer les effets de ces manipulations nous avons pour objectifs d'utiliser une approche anatomo-fonctionnelle combinant la description de l'activité de réseau suite à la manipulation ainsi que la description du développement de l'innervation périssomatique inhibitrice dans la couche pyramidale.

Cinquième objectif : Etudier les altérations de la maturation du réseau hippocampique dans un modèle murin de TSA

Enfin le dernier objectif résidait en la caractérisation de la maturation de l'activité de réseau dans la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe dans un modèle murin des troubles du spectre autistique (TSA).

MATERIELS, METHODES ET LIMITATIONS

1. Injection virale chez la souris nouveau-née

1.1 Injection intraventriculaire à P0 de l'indicateur calcique GCaMP6s

La première difficulté liée à l'objectif de réaliser de l'imagerie calcique *in vivo* chez la souris nouveau-née réside en la capacité à obtenir une expression suffisamment rapide, forte et stable d'un indicateur calcique permettant le suivi de l'activité neuronale. Plutôt que d'utiliser des modèles de souris transgéniques nous avons choisi d'induire l'expression de l'indicateur calcique génétiquement encodé GCaMP grâce à une injection virale. Afin d'obtenir une expression rapide, forte et stable de cet indicateur calcique nous avons utilisé un protocole d'injection virale intraventriculaire à P0 déjà décrit (Kim et al., 2013, 2014). Cela nous a permis d'obtenir dès P4-5 une expression du GCaMP suffisante pour réaliser l'imagerie calcique dans la région CA1 de l'hippocampe. Cette méthode d'injection peut être utilisée de façon plus générale pour obtenir une expression pan-neuronale de l'indicateur GCaMP et a permis de réaliser une partie de l'imagerie calcique couplée à la photo-stimulation holographique dans la région du cortex en barils chez le souriceau (Bollmann et al 2022, en révision) ainsi qu'à des expériences d'imagerie calcique dans la région CA1 de l'hippocampe réalisées chez la souris adulte (Boyce et al, en révision ; Vorobyev et al, en préparation).

1.2 Injections virales stéréotaxiques à P0

Afin d'étudier l'influence de l'activité des interneurons SST de l'hippocampe ou le rôle des cellules excitatrices du cortex entorhinal médian et du noyau réunis dans l'évolution de l'activité de la région CA1 au cours du développement, un protocole d'injection virale ciblée a été développé par Erwan Leprince (Leprince et al., 2022), doctorant dans l'équipe. Ici, il consiste en l'injection localisée à l'hippocampe, au réunis ou au cortex entorhinal d'un virus permettant l'expression du DREADD inhibiteur hM4DGi. Ce protocole a également été utilisé pour l'injection d'un vecteur viral permettant d'induire l'expression des protéines TVA et G couplée à la GFP dans l'hippocampe préalablement à l'injection d'un virus pseudo-typé modifié de la rage quelques jours plus tard dans les expériences de traçage rétrograde monosynaptique.

1.3. Injections virales stéréotaxiques chez le souriceau entre P5 et P9

Les expériences de traçage rétrograde ont nécessité l'injection intra-hippocampique du virus de la rage pseudo-typé. Ce protocole d'injection chez la souris âgée de quelques jours (P4-9) a été développé à partir d'un protocole d'injection utilisé en routine chez la souris adulte. Les souriceaux sont anesthésiés et placés dans un cadre stéréotaxique permettant une injection virale ciblée dans la région CA1 de l'hippocampe.

2. Chirurgie pour l'imagerie calcique *in vivo* dans l'hippocampe chez le souriceau

2.1 Méthode développée :

L'imagerie calcique dans la région de CA1 de l'hippocampe chez le souriceau non anesthésié n'avait jamais été réalisée dans l'équipe, cela a donc nécessité de mettre en place un protocole de chirurgie et d'imagerie permettant l'acquisition de données (Dard et al., 2022). Pour cela nous nous sommes appuyés à la fois sur l'expertise de l'équipe dans l'imagerie calcique *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe chez la souris adulte (Villette et al., 2015), et dans l'imagerie *in vivo* dans le cortex en baril chez le souriceau (Modol et al., 2020).

2.2 Limitations :

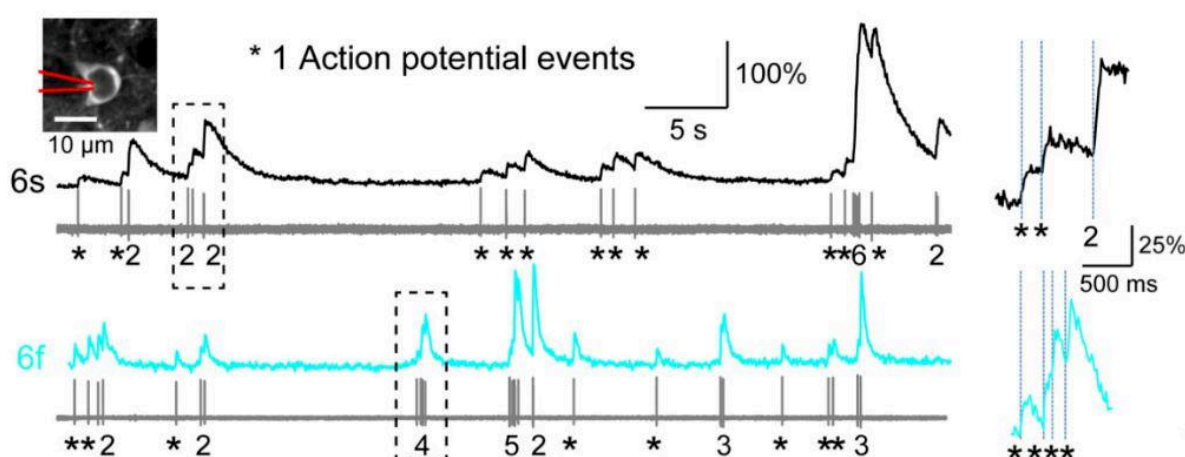
Ce protocole présente trois limitations principales. Premièrement, il ne garantit pas l'acquisition de données stables avec une bonne expression du GCaMP (champ d'imagerie de qualité sans artefacts de mouvements) dans plus de 30 à 40% des cas. Deuxièmement, il est difficilement compatible avec un suivi longitudinal de l'activité chez le même animal sur plusieurs jours consécutifs. Ce suivi longitudinal devient néanmoins bien plus réaliste chez des souris à partir du début de la 3^{ème} semaine de vie. Le dernier point critique est l'aspect invasif de la chirurgie qui consiste en un retrait des régions corticales se trouvant au-dessus de l'hippocampe, notamment une partie du cortex moteur et une partie du cortex somato-sensoriel. Cette limitation a été prise en compte en enregistrant de façon simultanée l'activité électrophysiologique de l'hippocampe dans les deux hémisphères après chirurgie (Dard et al., 2022).

3. Acquisition des données

3.1. Données d'imagerie : principes et limites

Afin d'enregistrer l'activité neuronale nous avons utilisé l'indicateur calcique génétiquement encodé GCaMP (Nakai et al., 2001). Cet indicateur est une protéine ingénierée qui est l'assemblage d'une protéine fluorescente verte (eGFP), de la calmoduline (une protéine modulée par le calcium) et du peptide M13 (portion d'une kinase régulant la myosine II). Lors de la fixation de calcium sur la partie calmoduline du GCaMP un changement conformationnel de la protéine conduit à l'émission de fluorescence après excitation. Différentes générations d'indicateur calcique GCaMP ont été développées (notamment dans le cadre du GENIE project).

A



B

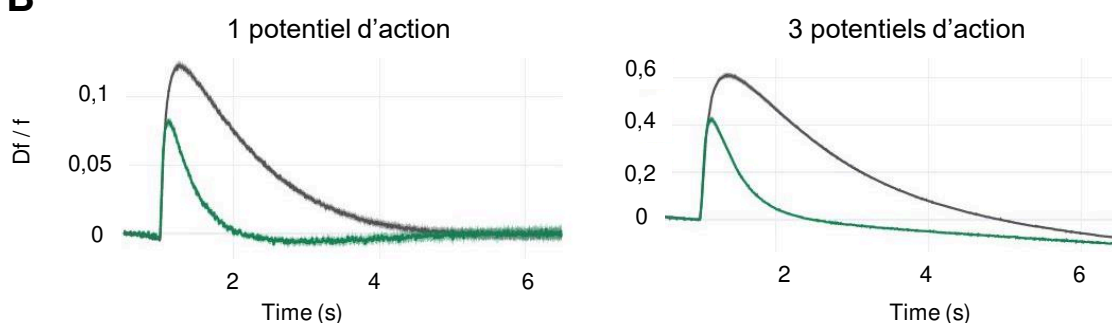


Figure M1 : Principe du suivi de l'activité neuronale via l'utilisation d'indicateur calcique GCaMP6.

A : extraite de (Chen et al., 2013) cette figure montre l'association entre le niveau de fluorescence du GCaMP et les potentiels d'actions émis par la cellule enregistrée pour deux version de l'indicateur GCaMP6 (6s et 6f). B : figure reconstruite à partir de <https://www.janelia.org/node/65790> montrant la variation de signal GCaMP moyenne ($\Delta f/f$) suite à l'émission d'un (à gauche) ou de trois (à droite) potentiel d'action pour le GCaMP6s (en noir) et le GCaMP6f (en vert).

Ici nous avons utilisé le GCaMP6s (Chen et al., 2013), en comparaison avec le GCaMP6f, cette version de l'indicateur nous a permis de maximiser le rapport signal sur bruit suite à une activation neuronale au détriment du temps de décroissance. Malgré le développement de nombreuses méthodes d'inférences des potentiels d'action émis par les cellules imagées, la reconstruction fidèle de l'activité des neurones imagés à l'échelle du potentiel d'action unique reste difficilement atteignable et dépendante des conditions d'imagerie. Il est en effet possible, comme le montre l'enregistrement simultané de l'activité électrophysiologique d'un neurone ainsi que ces variations de signal calcique (Figure M1), d'inférer précisément les potentiels d'action émis par le neurone en se basant sur le signal de fluorescence calcique. Cependant cela s'obtient en réalisant l'imagerie calcique avec une haute résolution spatio-

temporelle, typiquement (60 Hz and 0.12 μm per pixel - (Chen et al., 2013)). Ces enregistrements combinant électrophysiologie et imagerie calcique permettent d'obtenir une « ground truth », c'est-à-dire une activité calcique pour laquelle l'activité électrophysiologique du neurone est connue. Comme cela sera évoqué plus tard, il est possible en utilisant des paramètres d'imagerie similaire de prédire l'activité électrophysiologique des neurones imagés en utilisant le signal calcique seul. Cependant ces conditions d'imagerie ne sont que rarement compatibles avec l'objectif d'enregistrer simultanément un grand nombre de neurones, cas dans lequel il faut faire un compromis entre résolution spatiale, résolution temporelle et taille du champ d'imagerie. D'une certaine façon, on pourrait dire que l'imagerie calcique agit comme un filtre sur l'activité électrophysiologique. Même si les résultats obtenus par de l'imagerie calcique ou par de l'électrophysiologie sont conciliables (Siegle et al., 2021), il peut subsister des différences dans l'interprétation des données obtenues avec une méthode ou une autre et selon la méthode utilisée afin d'inférer l'activité à partir d'un enregistrement d'imagerie calcique (Evans et al., 2019; Wei et al., 2020). Les méthodes que nous avons utilisées pour la préanalyse des données d'imagerie et notamment l'inférence de l'activité des neurones enregistrés sont développées ultérieurement.

3.2. Comportement du souriceau lors de l'imagerie

Le comportement du souriceau lors des sessions d'imagerie a été suivi en utilisant deux approches. Premièrement, nous avons utilisé des capteurs piezzo-électriques disposés sous les pattes du souriceau afin de détecter ses mouvements. Dans un second temps, simultanément à l'imagerie calcique, le comportement du souriceau était filmé à l'aide de deux caméras infra-rouges disposées de part et d'autre de la souris. Ces enregistrements ont ensuite été synchronisés avec les données d'imagerie et manuellement annotés (Figure M2) afin de corrélérer l'activité neuronale observée avec le mouvement du souriceau. L'annotation du comportement du souriceau a été faite en catégorisant trois types de mouvements. Premièrement les mouvements complexes, ils correspondent aux mouvements observés lors des phases d'éveil. Deuxièmement, les « startles », il s'agit de mouvements brefs synchronisant l'ensemble des membres du souriceau. Troisièmement, les twitches que nous avons déjà introduit. Globalement ces trois catégories suivent la catégorisation des mouvements déjà définie (Hamburger, 1973).

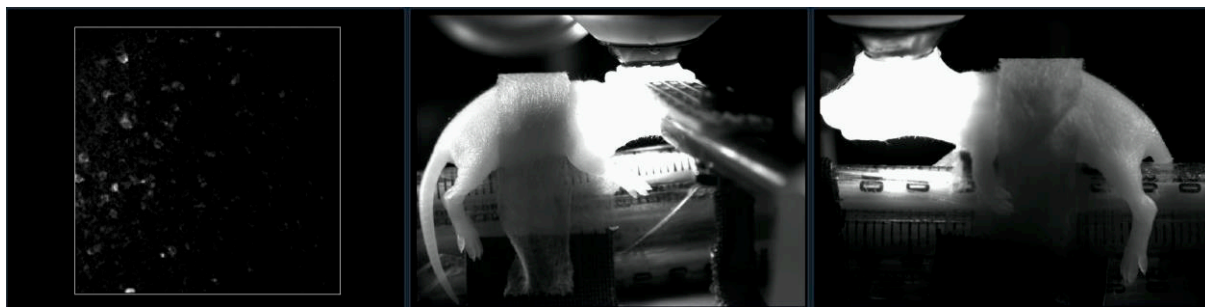


Figure M2 : Capture écran de la BADASS GUI incluse dans CICADA.

Cette interface permet la visualisation synchronisée de l'imagerie calcique (à gauche) et des caméras disposées de part et d'autre de la souris. On voit ici l'enregistrement d'une souris à P5.

4. Préanalyse des données d'imagerie calcique

La préanalyse des données consiste en la correction du mouvement, l'extraction des contours des cellules imagées ainsi que de leur activité individuelle à partir du film enregistré. Plusieurs suites d'analyses ont été développées dans ce but par de nombreuses équipes. Le principe de ces outils de préanalyse des données d'imagerie calcique est souvent d'inférer les potentiels d'action émis par les neurones imagés à partir de leur signal de fluorescence. Pour cela plusieurs algorithmes ont été développés et validés en utilisant des données d'imagerie acquise simultanément avec l'activité électrophysiologique du neurone.

4.1 Limitations des méthodes préexistantes

Dans une première approche nous avons utilisé la suite « CaImAn » (Giovannucci et al., 2018; Pnevmatikakis et al., 2016) utilisée en routine (Modol et al., 2020). Très brièvement, le but de cette suite est d'obtenir de façon simultanée les contours des cellules actives dans le champ d'imagerie ainsi que l'activité de chacune d'entre elles. De façon importante, cette méthode présente aussi l'intérêt d'offrir un « démixage » de l'activité au sens où un même pixel peut appartenir à plusieurs cellules si celles-ci sont partiellement superposées, l'activité de ce pixel contribue alors à l'activité d'une cellule ou d'une autre selon si les pixels coactifs appartiennent à une cellule ou une autre. Dans un second temps il est possible d'inférer l'émission de potentiels d'action des cellules imagées à partir des signaux calciques extraits. Cette inférence utilise des modèles optimisés sur les données obtenues en combinant enregistrement calcique et électrophysiologique. Ces modèles sont donc particulièrement adaptés pour la préanalyse de données d'imagerie calcique chez la souris adulte dans des régions telles que le cortex visuel ou le cortex en baril. Ce type de préanalyse s'est donc révélé délicat à utiliser dans nos données. En effet, nos données d'imagerie présentent deux contraintes à l'utilisation de cette méthode. Premièrement la zone imagée : la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe se caractérise par une très forte densité cellulaire conduisant à de nombreuses superpositions de cellules. Deuxièmement l'activité neuronale lors des phases précoces du développement est marquée par l'apparition d'activités récurrentes fortement synchrones. En conclusion, les données d'imagerie calcique *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe chez le souriceau présentent donc un fort taux de superposition de cellules fortement coactives. Comme présenté plus détails par une autre étude (Gauthier et al., 2018), la combinaison de ces deux facteurs réduit fortement la précision de cette suite d'analyse. De plus, il n'existe pas encore d'enregistrement simultané de l'activité calcique et électrophysiologique de neurones de la région CA1 de l'hippocampe chez le souriceau. Ceci rend d'autant plus compliqué l'optimisation des algorithmes permettant l'inférence des potentiels d'action émis par les neurones puisqu'ils n'ont jamais été testés et validés sur le genre de données d'imagerie que nous avons. En conséquence nous avons décidé de développer une suite de préanalyse orientée vers l'analyse de ce type de données.

4.2 Développement d'une nouvelle méthode de préanalyse

Concernant l'extraction des contours des cellules à partir du film notre choix s'est porté sur « suite2p » (Pachitariu et al., 2017). Il restait ensuite à développer une méthode d'analyse permettant d'inférer l'activité de chacune des cellules préalablement identifiées. Ici nous avons pris le parti de considérer un neurone actif lors du temps de montée de fluorescence (entre le déclenchement et le pic de l'activité calcique) à condition que cette augmentation de fluorescence soit visuellement identifiable et attribuable au neurone d'intérêt et non dû à un artefact (tel qu'évoqué dans la partie précédente). Ensuite, nous sommes partis du principe que s'il était possible d'observer directement dans le film qu'une augmentation de fluorescence correspondait bien à l'activation d'une cellule ou d'une autre, alors il serait possible d'entraîner un réseau de neurones artificiels à remplir cette fonction. Suivant cette idée nous avons développé DeepCINAC (Deep Calcium Imaging Neuronal Activity Classifier), un réseau de neurones artificiels, permettant après entraînement, d'inférer en deux étapes successives le type cellulaire des neurones imagés ainsi que leur activité individuelle (Figure M3). Tout le code développé à cette occasion est disponible en ligne (Gitlab - CossartLab Group ID : #5948056, Projet ID : # 14099446 ; <https://gitlab.com/cossartlab/deepcinac>). Ce travail a été effectué en collaboration

avec Julien Denis, doctorant dans l'équipe, et a donné lieu à une publication présentée en tant « qu'article méthodologique » dans la partie résultats (Denis et al., 2020).

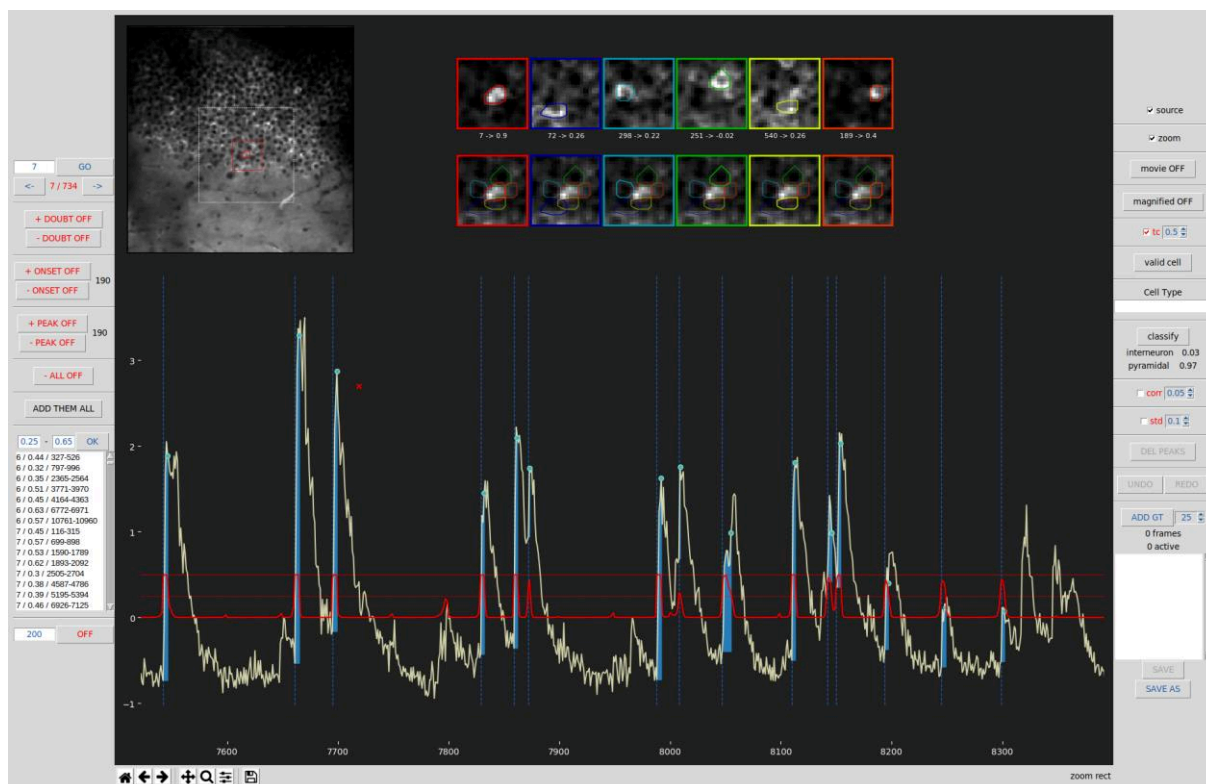


Figure M3 : Capture écran de l'interface graphique fournie dans DeepCINAC.

Cette interface permet de visualiser le signal calcique de toutes les cellules détectées. Elle permet également la visualisation directe du film d'imagerie centrée sur la cellule d'intérêt entre deux points temps manuellement définis. La visualisation du film permet d'annoter sur la trace calcique les transients correspondant à des activations de la cellule. Si l'activité de la cellule a été inférée au préalable par une autre méthode cette inférence peut être représentée au-dessous du signal calcique ce qui permet une rapide inspection visuelle des résultats obtenus. En complément cette interface permet de visualiser l'ensemble des cellules ayant au moins un pixel en commun avec la cellule d'intérêt. En complément de la visualisation du film, cela permet de vérifier qu'une augmentation de fluorescence observée sur le signal calcique correspond bien à une activation de la cellule d'intérêt et non pas d'une cellule adjacente. Cette interface a permis d'établir une « ground truth » visuelle avec laquelle nous avons entraîné le classificateur d'activité à inférer l'activité neuronale directement à partir de la visualisation du film d'imagerie calcique (Denis et al., 2020).

5. Analyse des données

5.1 Format NWB

Afin d'optimiser l'analyse de grands jeux de données de façon systématique, reproductible et partageable nous avons choisi de convertir toutes nos données dans le format standardisé international NWB : N (« Neurodata Without Borders : Neurophysiology ») (Rübel et al., 2022). Ce format NWB : N vise à unifier le format des données de neurophysiologie de façon ouverte. Il couvre notamment les données acquises en imagerie calcique *in vivo*, électrophysiologie intracellulaire ou extracellulaire et permet grâce à l'utilisation de différents modules de combiner et de synchroniser les données avec le comportement de l'animal mais aussi avec les conditions expérimentales utilisées. Pour cela nous avons mis en place le processus présenté ci-dessous (Figure M4) permettant la création d'un fichier NWB. Ce processus consiste en trois procédés principaux : le traitement de l'imagerie, le traitement du comportement, la synchronisation temporelle du comportement et de l'imagerie. Le traitement de l'imagerie se fait en plusieurs étapes. Les images sont d'abord réalignées pour corriger les artéfacts de mouvements, puis les contours des cellules sont extraits (contours), enfin à partir du film corrigé et des contours, l'activité neuronale est inférée en utilisant un classificateur de DeepCINAC (raster). En

complément nous procédons à l'extraction des signaux calciques de chacune des cellules (traces) ainsi que du type cellulaire des cellules imagées en utilisant un autre classificateur de DeepCINAC (cell-type). Le comportement des souriceaux est annoté manuellement à partir de la visualisation des vidéos (behaviour). Enfin la synchronisation temporelle de l'ensemble des données est permise par la lecture automatique d'un fichier contenant les signaux correspondant à l'acquisition de l'ensemble des images d'imagerie calcique et de comportement (timestamps). L'ensemble de ces données est combiné dans un fichier au format NWB.

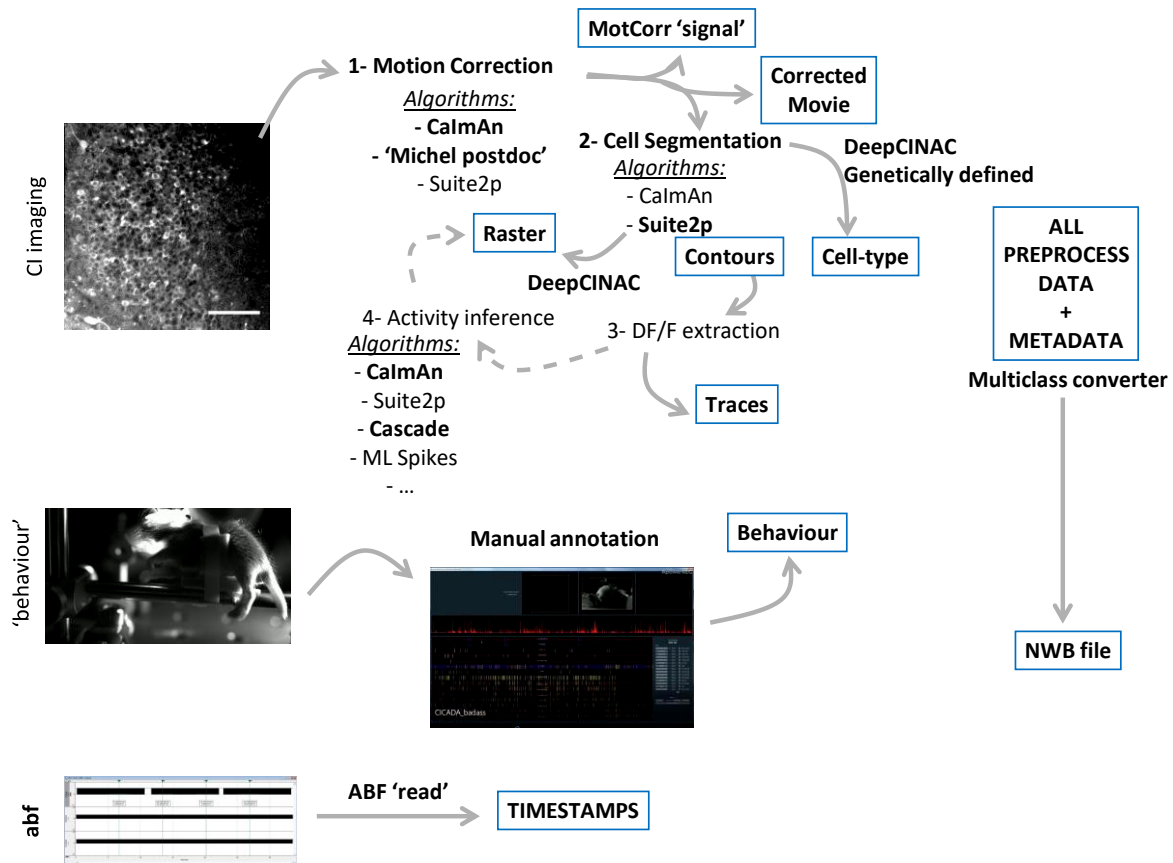


Figure M4 : Illustration du processus de préanalyse des données conduisant à la création d'un fichier NWB. Ce fichier combine les données d'imagerie, de comportement et métadonnées associées et permet une analyse automatisée de l'ensemble des données dans un format standard et partageable.

5.2 Développement de la suite d'analyse CICADA

Afin d'analyser les données mises en forme dans le format NWB, nous avons développé, en collaboration avec Julien Denis, CICADA (Calcium Imaging Complete Automated Data Analysis). Le développement de cette suite d'analyse n'a pas donné lieu à une publication mais tous les codes ont été publiés (Gitlab - CossartLab Group ID : #5948056, Projet ID : # 14048984 ; <https://gitlab.com/cossartlab/cicada>) et ont été fréquemment mis à jour selon les besoins en analyse soulevés par mon travail de thèse ainsi que par les besoins de l'équipe. Brièvement CICADA consiste en une interface graphique permettant successivement : la sélection des données (NWB) à analyser, le choix de l'analyse à réaliser, le paramétrage fin de l'analyse, et enfin la génération de figures (Figure M5). A chaque analyse réalisée est également associé un fichier de configuration permettant de relancer de façon exactement identique la même analyse assurant la reproductibilité des résultats.

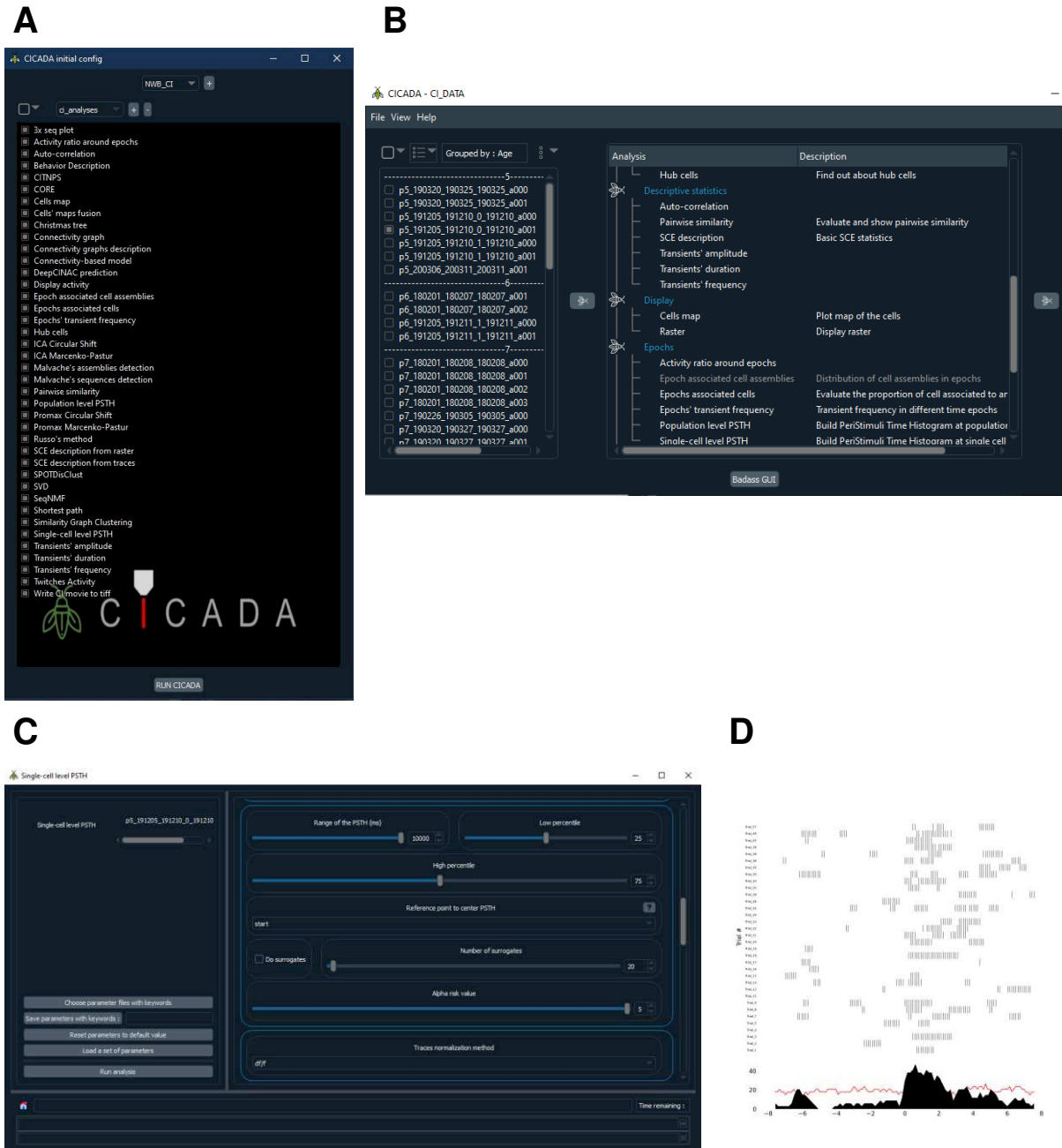


Figure M5 : Illustration du fonctionnement de CICADA.

A. Initialisation des analyses disponibles. **B.** Fenêtre principale permettant la sélection des fichiers NWBs à analyser (à gauche) et de l'analyse à réaliser (à droite). **C.** Fenêtre pop-up permettant la configuration de l'analyse sélectionnée. **D.** Figure obtenue, dans cet exemple un PMTH, pour une cellule unique chez un animal de 5 jours, centré sur le début des twitches (chaque ligne est un twitch), l'activité de la cellule est représentée par les traits noirs.

RESULTATS

1. Articles de thèse :

1.1 Article méthodologique : Denis J., Dard R.F. et al

Titre: “DeepCINAC: A Deep-Learning-Based Python Toolbox for Inferring Calcium Imaging Neuronal Activity Based on Movie Visualization.”

Auteurs : Julien Denis[‡], Robin F. Dard[‡], Eleonora Quiroli, Rosa Cossart, and Michel A. Picardo

Publication : ENeuro 7. (2020).

A- Résumé

Dans cet article nous présentons une nouvelle approche basée sur de l'apprentissage profond supervisé utilisée afin d'entraîner un réseau de neurones artificiels à inférer le type cellulaire et l'activité de neurones imagés en se basant directement sur la visualisation des images. Nous sommes parvenus à entraîner un classificateur permettant la catégorisation des cellules imagées en tant que cellules pyramidales ou interneurons avec une sensibilité de respectivement 90% et 82% et une précision de respectivement 90% et 91%. Nous avons pu ensuite entraîner des classificateurs d'activités permettant d'évaluer pour chaque neurone imagé sa probabilité d'être actif sur chacune de toutes les images du film d'imagerie calcique. Nous démontrons que le classificateur obtient une sensibilité médiane de 80% et une précision médiane de 91% sur des données d'imagerie calcique de la région CA1 de l'hippocampe en développement. Ces performances sont au-dessus des performances de CaImAn sur ce même jeu de données. Dans la suite de l'article nous démontrons le caractère versatile de cette approche par apprentissage profond qui permet, en variant les données d'entraînement fournies au réseau de neurones artificiels, de produire une gamme de classificateurs adaptée au besoin. En effet nous avons montré qu'en variant le jeu de données d'entraînement du classificateur nous pouvions obtenir des classificateurs très spécifiques, tel cinac_v3, performant très bien sur des données d'imagerie dans l'hippocampe adulte obtenues en utilisant l'indicateur calcique décalé vers le rouge GECO ou au contraire des classificateurs plus généralistes tel cinac_v4. En conclusion, cet article valide l'utilisation des classificateurs pour l'inférence du type cellulaire et de l'activité neuronale pour l'analyse des données conduisant au second article. C'est également une preuve de concept pour l'utilisation de ce type d'approche pour l'inférence de l'activité neuronale dans des données d'imagerie calcique variées.

B- Article

<https://www.eneuro.org/content/eneuro/7/4/ENEURO.0038-20.2020.full.pdf>

Novel Tools and Methods

DeepCINAC: A Deep-Learning-Based Python Toolbox for Inferring Calcium Imaging Neuronal Activity Based on Movie Visualization

Julien Denis,* Robin F. Dard,* Eleonora Quiroli, Rosa Cossart, and Michel A. Picardo

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0038-20.2020>

Aix Marseille Univ, INSERM, INMED, Marseille 13273, France

Abstract

Two-photon calcium imaging is now widely used to infer neuronal dynamics from changes in fluorescence of an indicator. However, state-of-the-art computational tools are not optimized for the reliable detection of fluorescence transients from highly synchronous neurons located in densely packed regions such as the CA1 pyramidal layer of the hippocampus during early postnatal stages of development. Indeed, the latest analytical tools often lack proper benchmark measurements. To meet this challenge, we first developed a graphical user interface (GUI) allowing for a precise manual detection of all calcium transients from imaged neurons based on the visualization of the calcium imaging movie. Then, we analyzed movies from mouse pups using a convolutional neural network (CNN) with an attention process and a bidirectional long-short term memory (LSTM) network. This method is able to reach human performance and offers a better F1 score (harmonic mean of sensitivity and precision) than CalmAn to infer neural activity in the developing CA1 without any user intervention. It also enables automatically identifying activity originating from GABAergic neurons. Overall, DeepCINAC offers a simple, fast and flexible open-source toolbox for processing a wide variety of calcium imaging datasets while providing the tools to evaluate its performance.

Key words: calcium imaging; CNN; deep learning; hippocampus; LSTM; neuronal activity

Significance Statement

Inferring neuronal activity from calcium imaging data remains a challenge because of the difficulty in obtaining a ground truth using patch clamp recordings and the problem of finding optimal tuning parameters of inference algorithms. DeepCINAC offers a flexible, fast and easy-to-use toolbox to infer neuronal activity from any kind of calcium imaging dataset through visual inspection.

Introduction

In vivo calcium imaging is widely used to study activity in neuronal microcircuits. Advances in imaging now allows for the simultaneous recording of several thousands of neurons (Stringer et al., 2019). One difficulty resides in how to infer single neuron activation dynamics from changes in fluorescence of a calcium indicator. A challenge is therefore to offer an analytical tool that would be scalable to the wide variety of calcium imaging datasets while providing reliable analysis.

State-of-the-art computational tools to infer neuronal activity (such as CalmAn; Pnevmatikakis et al., 2016; Giovannucci et al., 2019) are based on the deconvolution and demixing of fluorescence traces from segmented cells. However, to optimize the deconvolution parameters, a ground truth based on simultaneous targeted patch-clamp recordings and two-photon imaging is necessary (Chen et al., 2013; Evans et al., 2019).

Moreover, an analysis based on the fluorescence traces even after a demixing process can still be biased by

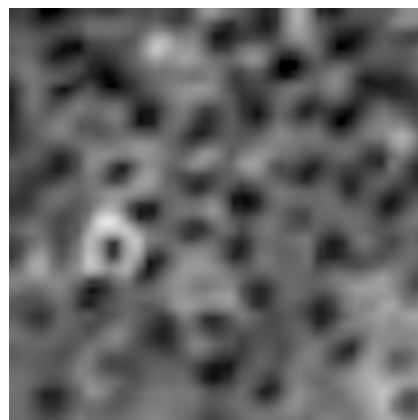
Received February 3, 2020; accepted July 10, 2020; First published July 22, 2020.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: J.D., R.F.D., R.C., and M.A.P. Designed Research; R.F.D. and J.D. Performed Research; J.D. Wrote code; M.P., J.D., R.F.D., and E.Q., Labeled data; R.F.D., J.D., M.A.P., and R.C. Wrote the paper.

overlapping cells (Gauthier et al., 2018). In a recent study from Gauthier and collaborators (Gauthier et al., 2018) analyzing calcium imaging data recorded in the region CA1 in adult rodents (Gauthier and Tank, 2018), 66% of the cells were reported as having at least one false transient, and overall, among 33,090 transients (from 1325 sources), 67% were considered as true, 13% as false, and 20% were unclassified. Those contaminations increase the risk of misinterpretation of the data. Inferring neuronal activity from the developing hippocampus *in vivo* is even more challenging because of several factors: (1) recurring network synchronizations are a hallmark of developing neuronal networks (Provine, 1972; Galli and Maffei, 1988; Ben-Ari et al., 1989; O'Donovan, 1989), which results in frequent cell co-activations, (2) the somata of pyramidal neurons are densely packed which results in spatial overlap, (3) different calcium kinetics are observed in the same field of view (because of different cell types and different stages of neuronal maturation; Allene et al., 2012). All these points are illustrated in Movie 1, Movie 2 (region CA1 of the hippocampus from mouse pups). In addition, most methods do not offer solutions to evaluate the performance of neuronal activity inference on user datasets. To meet those challenges, we have developed a graphical user interface (GUI) that allows for such evaluation through data exploration and a method based on deep learning to infer neuronal activity. Even if several deep-learning-based methods to infer neuronal activity from fluorescence signals have already been developed (Berens et al., 2018), none proposes a method directly based on raw two-photon imaging signals.

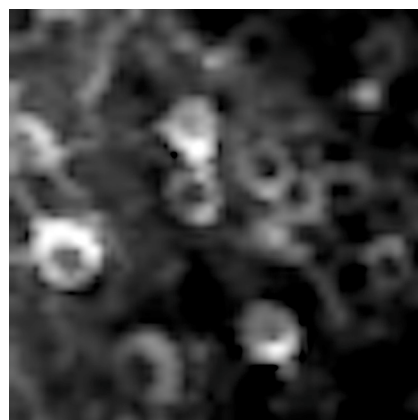
Our goal was to train a classifier to recognize cell activation directly from a movie which falls into the domain of action recognition. Action recognition from videos has seen recent important progress thanks to deep learning (Bin et al., 2019). Using a similar approach, we have trained a binary classifier on calcium imaging movies (allowing us to explore both the forward and backward temporal information among the whole sequence of video frames) to capture the fluorescence dynamics in the field of view and then predict the activity of all identified cells. It gave us the opportunity to take full advantage of the information contained in the movie in terms of dynamics and potential overlaps or other sources of contamination that



Movie 1. *In vivo* two-photon imaging in the CA1 region of the hippocampus in a 12-d-old mouse pup. Field of view (FOV) is $80 \times 80 \mu\text{m}$, frame rate is 8 Hz, and video is speeded up 10 times. The video shows recurrent periods of neuronal activations recruiting a large number of adjacent neurons leading to spatial and temporal overlaps. [View online]

might not be accessible when working only on fluorescence time courses.

To train the classifier, a ground truth was needed. To our knowledge, no calcium imaging datasets from the developing hippocampus *in vivo* with simultaneous electrophysiological ground truth measurements are available. The most accurate ground truth would require targeted patch-clamp recordings with two-photon imaging on all the different hippocampal cell types with different calcium dynamics. This is technically difficult, time consuming, and even more during development as the ground truth must be obtained from cells at various stages of maturation. As a result, we decided to base the ground truth on the visual inspection of raw movies using a custom-made GUI. It gives the advantages to work on any kind of calcium imaging dataset and to offer an easy tool to benchmark methods that infer neuronal activity.



Movie 2. *In vivo* two-photon imaging in the CA1 region of the hippocampus in a 7-d-old mouse pup. Field of view (FOV) is $100 \times 100 \mu\text{m}$, frame rate is 8 Hz, and video is speeded up 10 times. The Video shows different cell types (i.e., interneurons and pyramidal cells) with different calcium dynamics. [View online]

This work was supported by the European Research Council under the European Union's FP7 and Horizon 2020 research and innovation program Grants 242842 and 646925. J.D. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale Grant FDM20170638339. M.P. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale Grant ARF20160936186.

*J.D. and R.F.D. contributed equally to this work.

Acknowledgements: We thank the Centre de Calcul Intensif d'Aix-Marseille for granting access to its high-performance computing resources. We would like to thank Marco Bocchio, Laura Modol, Yannick Bollmann, Susanne Reichinnek and Vincent Villette for providing us calcium imaging data.

Correspondence should be addressed to Julien Denis at julien.denis@inserm.fr.

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0038-20.2020>

Copyright © 2020 Denis et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

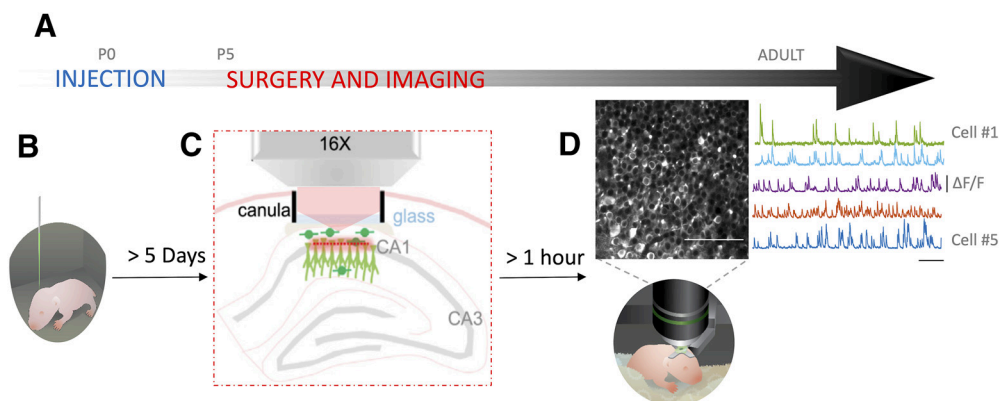


Figure 1. Experimental paradigm. **A**, Experimental timeline. **B**, Intraventricular injection of GCaMP6s on pups (drawing) done at P0. **C**, Schematic representing the cranial window surgery. **D**, top left, Imaged field of view. Scale bar: 100 μ m. Top right, Activity of five random neurons in the field of view (variation of fluorescence is expressed as $\Delta F/F$). Scale bar: 50 s. Bottom, Drawing of a head fixed pup under the microscope.

The GUI offers a tool to precisely and manually detect all calcium transients (from onset to peak, which is the time when cells are active). We collected and combined a corpus of manual annotations from four human experts representing 37 h of two-photon calcium imaging from 11 mouse pups aged between five and 16 postnatal days in the CA1 region using GCaMP6s. Almost 80% of the labeled data were used to train the model, while the rest was kept to benchmark the performance. Then, movies were processed using a convolutional neural network (CNN) with an attention mechanism and a bidirectional long-short term memory (LSTM) network (LeCun and Bengio, 1995; Hochreiter and Schmidhuber, 1997; Vaswani et al., 2017).

To evaluate the method, we used the ground truth as a benchmark. We found that this method reached human level performance and offered a better sensitivity and F1 score than CalmAn to infer neuronal activity in the developing hippocampus without any user intervention. Overall, DeepCINAC (Calcium Imaging Neuronal Activity Classifier) offers a simple, ergonomic, fast, and flexible open-source toolbox for processing a wide variety of calcium imaging data while providing the tools to evaluate its performance.

Materials and Methods

In this section, we will describe all the necessary steps to build a deep learning neural network “DeepCINAC.” This toolbox was developed to analyze *in vivo* two-photon calcium imaging data acquired in the developing hippocampus (see below, Experimental procedure and data acquisition). As a first step, we needed to set a ground truth that was established on the visualization of the recorded movie by three to four human experts (see below, Ground truth). Then, data are preprocessed (see below, Data preprocessing, feature engineering, and model description) and used to train the network (see below, Computational performance). As a final step, we used labeled data to evaluate the performance of DeepCINAC (see below, Performance evaluation). Tutorials and the source code are freely available online (see below, Toolbox and data availability).

Experimental procedure and data acquisition

All experiments were performed under the guidelines of the French National Ethic Committee for Sciences and Health report on Ethical Principles for Animal Experimentation in agreement with the European Community Directive 86/609/EEC.

Viral injection

To induce widespread, rapid and stable expression of the calcium indicator GCaMP6s in hippocampal neurons at early postnatal stages, we intraventricularly injected a viral solution (pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40, Addgene #100843-AAV1) at P0 (Postnatal day zero) in mouse pups of either sex (Fig. 1A,B). This injection protocol was adapted from already published methods (Kim et al., 2013, 2014). Mouse pups were anesthetized on ice for 3–4 min, and 2 μ l of the viral solution were injected in the left lateral ventricle which coordinates were estimated at the 2/5 of the imaginary line between the λ and the eye at a depth of 400 μ m. Expression of GCaMP was checked on slices and was sufficient for *in vivo* imaging as early as P5, which is consistent with already published data (Kim et al., 2014). In addition, GCaMP expression, brightness, and kinetics of the reporter was then stable throughout all developmental stages used (data not shown).

Surgery

The surgery to implant a 3-mm-large cranial window above corpus callosum was adapted from described methods (Dombeck et al., 2010; Villette et al., 2015). Anesthesia was induced using 3% isoflurane in a mix of 90% O₂–10% air and maintained during the whole surgery (~1:30 h) between 1% and 2.5% isoflurane. Body temperature was controlled and maintained at 36°C. Analgesia was controlled using Buprenorphine (0.025 mg/kg). Coordinates of the window implant were estimated by eyes. The skull was removed and the cortex was gently aspirated until the external capsule/alveus that appears as a plexus of fibers was visible. Surface of the corpus callosum was protected with QuickSil (WPI) then the canula with the window was implanted and fixed to the headplate of the animal.

Imaging

Two-photon calcium imaging experiments were performed on the day of the surgery (Fig. 1C,D) at least 1 h after the end of the surgery. A total of 12,500-frames-long image series from a $400 \times 400 \mu\text{m}$ field of view with a resolution of 200×200 pixels were acquired at a frame rate of 10.6 Hz (Fig. 1D). We then motion corrected the acquired images by finding the center of mass of the correlations across frames relative to a set of reference frames (Miri et al., 2011).

Cell segmentation

To detect cell contours, we used either the segmentation method implemented in suite2p (Pachitariu et al., 2017) or the Constrained Nonnegative Matrix Factorization (CNMF) implemented in CalmAn.

Activity inference

To infer activity, we used the Markov chain Monte Carlo (MCMC) implemented in CalmAn on cell contours obtained from the CNMF of the toolbox. The MCMC spike inference was done as described (Pnevmatikakis et al., 2016). We used DeepCINAC predictions on both contours from suite2p and CalmAn.

Data visualization: GUI

To visualize our data and explore the results from any spike inference method, we designed a GUI that provides a visual inspection of each cell's activity (Fig. 2). The GUI offers a set of functionalities allowing visualization of (1) calcium imaging movies centered and zoomed on the cell of interest during a time window that includes a given transient; (2) sources, transient profiles, and their correlations (as developed by Gauthier and collaborators); and (3) transient fluorescence signal shape.

Additionally, the GUI can be used to (1) display the spike times from an inference method (Fig. 2A1,A2), (2) establish a ground truth (Fig. 2B), and (3) visualize DeepCINAC predictions (Fig. 2C).

The GUI was developed using Python and Tkinter package. It can read data from several formats including neurodata without borders files (Teeters et al., 2015; Rübél et al., 2019). More details on the GUI and a complete tutorial are available on GitLab (<https://gitlab.com/cossartlab/deepcinac>).

Ground truth

Electrophysiological ground truth

Ground truth data from experiments previously described were taken from crns.org. (Chen et al., 2013; GENIE Project, 2015). Briefly, visual cortex neurons expressing the calcium indicator GCaMP6s were imaged while mice were presented with visual stimuli; 60-Hz two-photon imaging and loose cell-attached recordings at 10 kHz were performed simultaneously. Using ImageJ software, we downsampled imaging data to 10 Hz by averaging every six frames and rescaled it to $1.2 \mu\text{m}/\text{pixel}$. We considered a cell active during a rise time if a spike was detected during that time and used the previously described GUI to convert those data in the cinac format so we could produce benchmarks and train a classifier using

those data (for more details, see Table 1; Extended Data Table 1-1).

Visual ground truth

All functionalities of the GUI were used as criteria by each human expert to label the data. The ground truth was established based on two-photon calcium imaging from pups from 5 to 16 d old (see Table 1) in a four-step workflow as described in Figure 3. Data were selected and labeled at least by two independent human experts (Fig. 3, steps 1 and 2). We then combined those labels (Fig. 3, step 3), and a final agreement was decided by three to four human experts (Fig. 3, step 4). In addition, we trained another classifier for interneurons using transgenic pups in which only interneurons express the indicator (Melzer et al., 2012). As previously described, interneurons' activity was labeled by three or four human experts and used to train an interneuron specific classifier (CINAC_v7; see Table 1). After training our classifier on a first set of cells, we used the predictions obtained on new data to establish additional ground truth based on the mistakes made on those data. At least two human experts labeled segments of 200 frames containing the wrong predictions. Additional visual ground truth was established by one human-expert (R.F.D.) on three other datasets from our lab using the GUI: (1) GCaMP6s calcium imaging movies from the developing barrel cortex ("Barrel-ctx-6s," 1.5 Hz, $1.2 \mu\text{m}/\text{pixel}$; Modol et al., 2020), (2) GCaMP6m imaging movies ("Hippo-6m," 10 Hz, $2 \mu\text{m}/\text{pixel}$), and (3) GECO imaging movies ("Hippo-GECO," 5 Hz, $2 \mu\text{m}/\text{pixel}$) both from the adult hippocampus (for details, see Extended Data Table 1-1). For Barrel-ctx-6s and Hippo-GECO, the CalmAn spike inference had already been performed by the original experimenter. We performed CalmAn spike inference on Hippo-6m.

Cell type ground truth. We used calcium imaging movies from GadCre (Melzer et al., 2012) positive animals injected with both h-SynGCaMP6s and Cre-dependent TdTomato to identify interneurons by the overlap of GCaMP6s and TdTomato signals. Using the GUI, we manually categorized 743 cells from 85 recordings among three categories: interneuron, pyramidal cell, and noisy cell. A total of 283 TdTomato-expressing cells were categorized as interneurons; 296 cells were categorized as putative pyramidal cells based on their localization in the pyramidal layer, their shape and their activity. Finally, 164 cells were categorized as noisy cells, determined by visually estimating their signal-to-noise ratio. We used a total of 643 cells (245 interneurons, 245 putative pyramidal cells, and 153 noisy ones) to train the cell type classifier and 100 cells (38 interneurons, 51 putative pyramidal cells, and 11 noisy ones, not included in the training dataset) were used to evaluate it.

Data preprocessing, feature engineering, and model description

Definition of training, validation, and test datasets

Our main dataset was split between a test dataset and a dataset used to train the classifier (referred to as training dataset; see Table 1; Extended Data Table 1-1). The

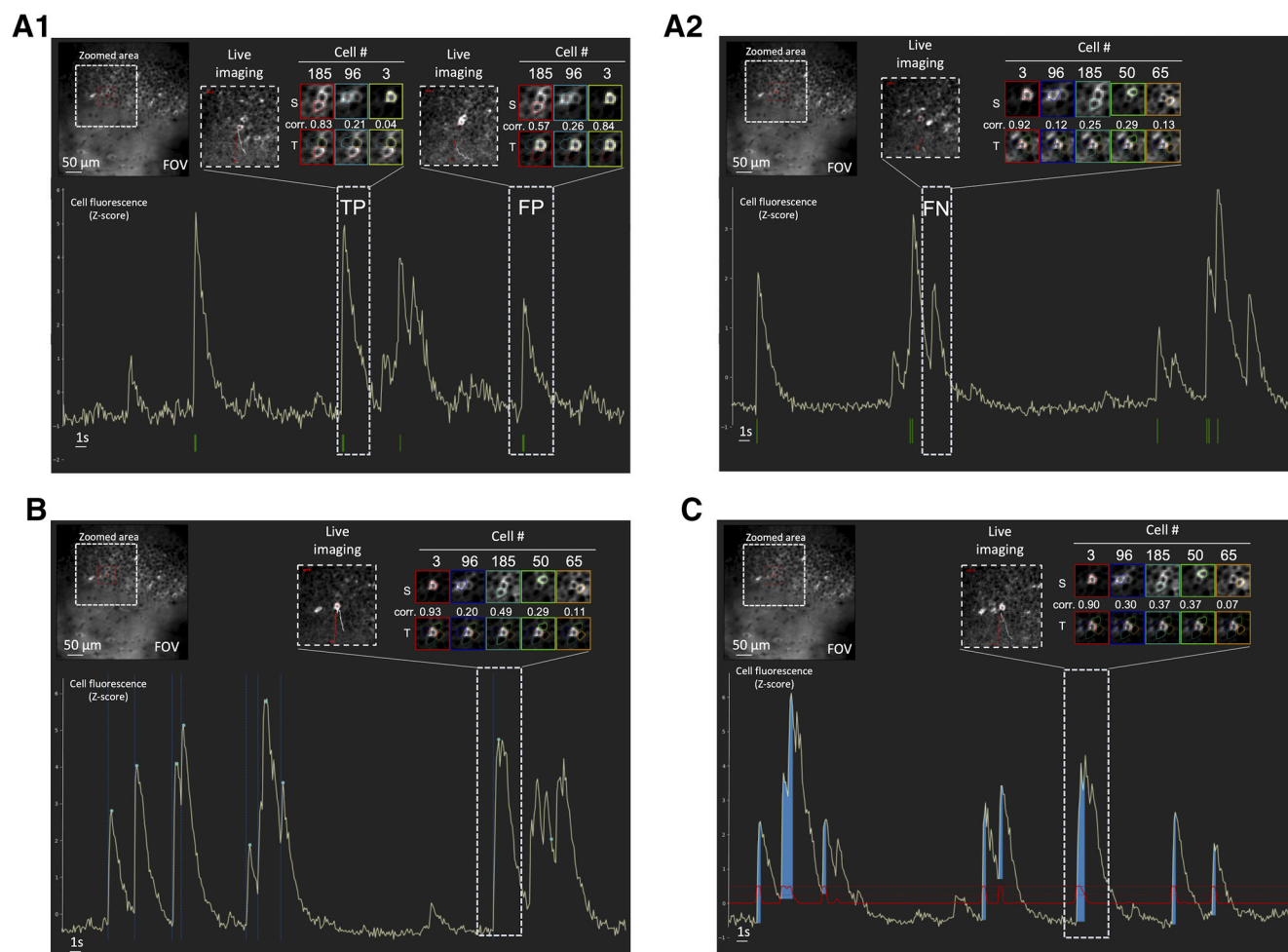


Figure 2. Examples of different uses of the GUI. The GUI can be used for data exploration (**A1**, **A2**), to establish the ground truth (**B**) and to evaluate DeepCINAC predictions (**C**). **A**, The GUI can be used to explore the activity inference from any methods. The spikes inferred from CalmAn are represented by the green marks at the bottom. The GUI allows the user to play the movie at the time of the selected transient and visualize the transients and source profile of the cell of interest. **A1**, Movie visualization and correlation between transient and source profiles allow the classification of the first selected transient as true positive (TP) and the second selected transient as false positive (FP). **A2**, Movie visualization and correlation between transient and source profiles allow the classification of the selected transient as false negative (FN). **B**, The GUI can be used to establish a ground truth. In this condition, it offers the user the possibility to manually annotate onset and peak of calcium transient. Onsets are represented by vertical dashed blue lines, peaks by green dots. **C**, When the activity inference is done using DeepCINAC, the GUI allows the display of the classifier predictions. The prediction is represented by the red line. The dashed horizontal red line is a probability of one. The blue area represents time periods during which the probability is above a given threshold, in this example 0.5. T: transient profile, S: source profile, Corr: correlation, FOV: field of view.

training dataset used as the input of the classifier was randomly split with a ratio of 80–20% on a training and validation dataset. Validation data are used at the end of each epoch of the training to update the weights of the classifier.

Data preprocessing and feature engineering

Calcium movies in tiff format were split into individual tiff frames to be efficiently loaded in real time during the data generation for each batch of data fed to the classifier. For any given cell, a batch was composed of a sequence of 100 frames of 25×25 pixels window centered on the cell body. The length of the batch was chosen to fit for interneurons activity (rise and decay time). The window

size was adapted to capture the activity of cells overlapping the target cell. In a recording of 12,500 frames, the number of transients ranges from 10 to 200, approximately. Thus, the frames during which the cell is active (from onset to peak), represents a low percentage of the total data. Because manual labeling is time consuming, the data used as ground truth were limited in size. To overcome the issue of the imbalanced data and to enlarge the dataset, we used the following three approaches.

Number 1: data augmentation (Perez and Wang, 2017). Temporal and spatial data augmentation was used. Temporal augmentation was used in that each block of 100 frames was overlapping with each other using a sliding window of 10 frames of length. Spatial augmentation

Table 1: Data used to train the classifiers

	CINAC version*	<i>n</i> cells	<i>n</i> animals	<i>n</i> frames
Hippo-dvt	v1 v4 v6	104 ¹	13 ²	689,272
Hippo-GECO	v3	5	2	45,000
Hippo-6m	v4	3	1	42,000
Barrel-ctx-6s	v4	20	2	36,000
Visual-ctx-6s	v5 v6	7	NA	33,800
Hippo-dvt-INS	v7	29	9	362,500

Training dataset include validation dataset (see Materials and Methods). Description of the datasets precising the number of frames, number of animals and field of views included, as well as the classifiers that used these datasets.

n: number of.

* version that used at least part of those dataset.

¹ including two simulated movies, representing 32 cells and 80,000 frames.

² including two simulated movies.

Table 1 is supported by Extended Data Table 1-1.

took the form of transformations such as flip, rotation, or translations of the images. The data augmentation was done online, meaning that the transformations were done on the mini-batches that the model was processing. This allowed avoiding memory consumption and generating a dataset on multiple cores in real time.

Number 2: simulated data. To balance our dataset, and increase the ability of the network to predict a fake transient as false, we have simulated calcium imaging movies with a higher rate of overlapping activity than our dataset (an example of artificial movie is available online on the GitLab page, alongside the source code: <https://gitlab.com/cossartlab/deepcinac>). We started by collecting >2000 cell contours from several movies that were segmented using suite2p. We randomly picked contours to build a cell map, with 16 cells for which one to four cells are overlapping it. We then generated for each cell an activity pattern, with a randomly chosen number of transients (from 2 to 16 for 1000 frames, 1.2–9.6 transients/min for a 10-Hz sampling rate) and duration of rise time (from one to eight frames, 100–800 ms for a 10-Hz sampling rate), following a random distribution. To simulate the fluorescence signal, on the rise time, we use a linear fit from the onset to peak, for the decay, we use an exponential decay with a decay from 10 to 12 frames of duration. To generate the calcium imaging movie, we decided on a basal level of activity, and then we adjusted the intensity of pixels in the cell for each frame according to the amplitude of the cell fluorescence, pixels in the cell have a

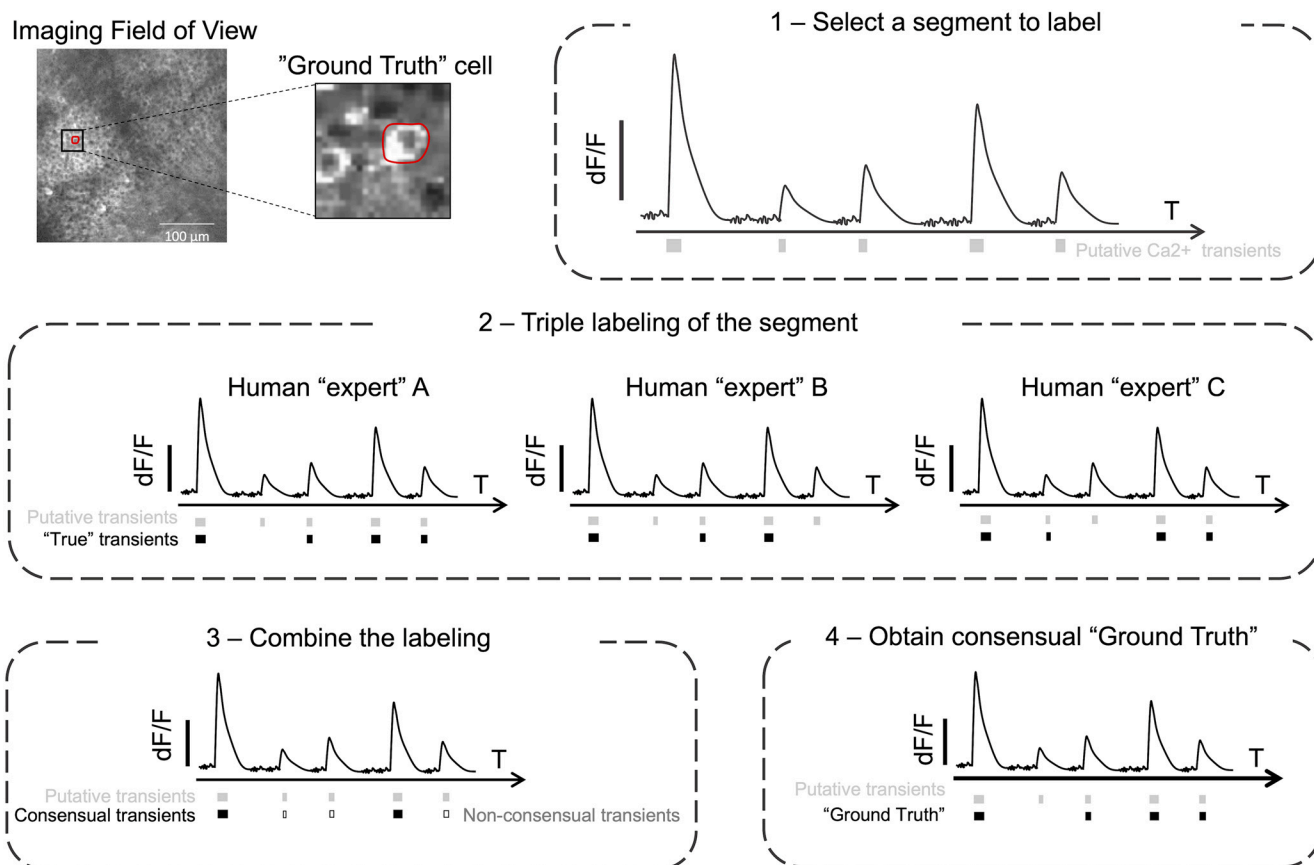


Figure 3. Workflow to establish the ground truth. First, a cell was randomly chosen in the imaged field of view. **1**, All putative transients of the segment to label were identified for the onset to the peak of each calcium event. **2**, Three human experts [“expert” (A), “expert” (B), “expert” (C)] independently annotated the segment. Among all putative transients, each human expert had to decide whether it was in his opinion a true transient. **3**, The combination of the labeling lead to “consensual transients” (i.e., true transient for each human expert; black square) and to “non-consensual transients” (i.e., true transient for at least one human expert but not all of them; open square). **4**, All non-consensual transients were discussed and ground truth was established.

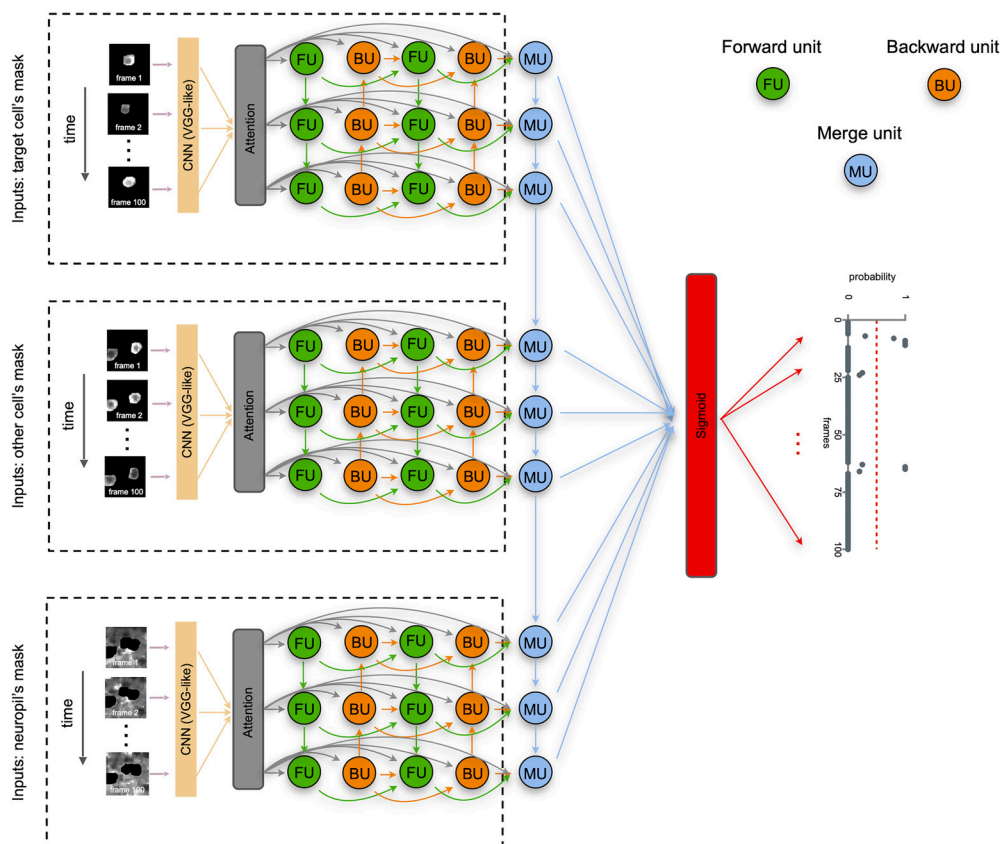


Figure 4. Architecture of DeepCINAC neural network. As a first step, for each set of inputs of the same cell, we extract CNNs features of video frames that we pass to an attention mechanism and feed the outputs into a forward pass network (FU, green units) and a backward pass network (BU, orange units), representing a bidirectional LSTM. Another bidirectional LSTM is fed from the attention mechanism and previous bidirectional LSTM outputs. A LSTM (MU, blue units) then integrates the outputs from the process of the three types of inputs to generate a final video representation. A sigmoid activation function is finally used to produce a probability for the cell to be active at each given frame given as input.

different weight depending on whether they are in the soma or not, their intensity being lower in the nucleus. We finally added some Gaussian noise ($\mu = 0$, $\sigma^2 = 0.1$) on every frame.

Number 3: data stratification. In order to balance the data, we used data augmentation on selected movie segments (underrepresented segments) and excluded others (overrepresented segments) from the training dataset. After data stratification, we obtained $\sim 60\%$ of the movie segments containing at least one real transient, 30% at least one fake transient without real ones, and 10% without transients. We were then able to be more precise over the proportion of segments with multiple transients or cropped transients. We gave higher weights to segments containing fake transients in order for the network to adjust the accuracy accordingly.

The data augmentation, simulated data and stratification were applied to the part of the training dataset not used for validation.

Model description

To perform action recognition, we designed a joint model combining a forward-pass LSTM, a backward-pass LSTM and CNN features. In order for the bidirectional LSTM to

focus on relevant information, we reinforced it by an attention process at the stage of encoding similar to previous work (Bin et al., 2019; Rémy, 2019). The model was designed using Python and Keras library (Chollet, 2015; see Fig. 4).

The model used to predict the cell activity takes three inputs, each representing the same sequence of 100 frames (around 10 s of activity). Each frame had dimensions of 25×25 pixels, centered around the cell of interest, whose activity we want to classify. The first input has all its pixels set to zero except for the mask of the cell of interest (cell activity). The second input has all its pixels set to zero except for the mask of the cells that intersect the cell of interest (overlapping activity). The final input has the cell of interest and the one intersecting its pixels set to zeros (neuropil activity). That way, the model has all the information necessary to learn to classify the cell's activity according to its fluorescence variation.

The model used to predict the cell type takes two inputs, each representing the same sequence of 500 frames (around 50 s of activity). Each frame had dimensions of 20×20 pixels, centered around the cell of interest, whose cell type we want to classify. The first input has all its pixels set to zero except for the mask of the cell of interest (cell activity). The second input has all its pixels.

We used dropout (Srivastava et al., 2014) to avoid overfitting, but no batch normalization. The activation function was swish (Ramachandran et al., 2017). The loss function was binary cross-entropy and the optimizer was RMSprop. To classify cell activity, the output of the model was a vector of length 100 with values between 0 and 1 representing the probability for the cell to be active at a given frame of the sequence. To classify the cell type (interneuron, pyramidal cell, or noisy cell), the output was three values ranging from 0 to 1 and whose sum is equal to 1, representing the probability for a cell to be one of those three cell types.

Computational performance

Classifier training

We trained the classifier on a Linux-based HPC cluster where 4 CPUs (Intel(R) Xeon(R) CPU EV-2680 v3), 320 GB of RAM and 2 bi-GPU NVIDIA Tesla V100 were allocated for the processing task. To give an estimation of the time required to complete the training, the general classifier (CINAC_v1) was trained over 14 epochs. Training took around 40 h (<3 h by epoch).

Classifier prediction

Using Linux-based workstation with one GPU (NVIDIA GeForce GTX 1080), 12 CPUs (Intel Xeon CPU W-2135 at 3.70 GHz), and 64 GB of RAM, the time to predict the cell activity on a movie of 12,500 frames was on average 13 s, ~3.5 h for 1000 cells. The time to predict the cell type on a movie of 12,500 frames was on average 2 s, ~33 min for 1000 cells. Similar performance was achieved using Google Colab.

Performance evaluation

Descriptive metrics for activity classifier: sensitivity, precision, F1 score

We evaluated the performance of the activity classifiers which predict for each frame if a cell is active or not. We chose to measure the sensitivity and precision values, as well as the F1 score that combines precision and sensitivity into a single metric defined as the harmonic mean of precision and sensitivity (Géron, 2019). Because we have a skewed dataset (cells being mostly inactive), we chose not to use the accuracy. The output of the binary classifier being the probability for a cell to be active at a given frame, we considered that a transient was predicted as true if at least during one of its frames the cell was predicted as active. On this basis, we were then able to compute the sensitivity (defined as the proportion of real transients that were detected) and the precision (defined as the proportion of detected transients that are real transients). We used these metrics to base the choice of the “best” epoch on the classifier performance on the test dataset rather than the performance on validation dataset. However, we stopped the training when the validation dataset metrics reached a plateau.

Descriptive metrics for cell type classifier: sensitivity, precision, F1 score

We evaluated the performance of the cell type classifier which predicts the type of a cell. We chose to measure

the sensitivity and precision values, as well as the F1 score. To do so we used the metrics module of the Python package scikit-learn (Pedregosa et al., 2011) that returns the confusion matrix and a classification report containing those metrics.

Statistical analysis

The distribution of F1 score values on the datasets for each inference method were compared using Wilcoxon signed-rank test with an a priori significance level of $p = 0.05$ using scipy Python package (Virtanen et al., 2020). This test was performed only on distribution with >15 samples. Significance level: we used * for $0.01 \leq p < 0.05$, ** for $0.001 \leq p < 0.01$, and *** for $p < 0.001$.

Detection of overlap activity

Based on empirical research we found that 15% of overlap was the minimal size above which a true transient in the cell is sufficient to trigger a false transient in the overlapped cell. For all pairs of overlapping cells (with an intersected area of at least 15% of the highest area of the two cells), we computed their transient profiles over all putative activations (all rise time over the full recording) and then calculated the Pearson correlation with their respective cell source profile. To assure to attribute the correct transient to the truly active cell we used a high correlation threshold 0.7 for the first cells and low threshold for the second cell of 0.2. We considered that the transient was a true activation of the first cell leading to a false transient in the second one. Indeed, we observed that the correlation method such as the one used in Gauthier et al. (2018) is not always sufficient to classify correctly the transient activity. However, by using the combination of a very low and high threshold, we assure (in most of the cases) that one cell is having a false transient while the other one is truly active. Finally, we evaluated whether the classifier could classify the putative transient of the second cell as false (with a prediction <0.5).

Comparison with CalmAn

We compared the classifier performance against a state-of-the-art computational tool, namely, CalmAn. To fairly compare CalmAn and DeepCINAC to the ground truth, we used the cell contours obtained from the CNMF. The spike inference from the MCMC as well as DeepCINAC predictions and the ground truth were established on these contours. A transient was considered as detected by CalmAn if at least one spike was inferred during the rise time of the transient.

DeepCINAC workflow

To summarize, DeepCINAC uses .cinac files built using the GUI. To train a classifier, those files are given as inputs to the neuronal network, providing time series data representing the calcium fluorescence dynamics of the cells. The same files can be used to benchmark the performance of a classifier and using the GUI, it is possible to add new data for training based on the errors of previous classifier outputs (Fig. 5).

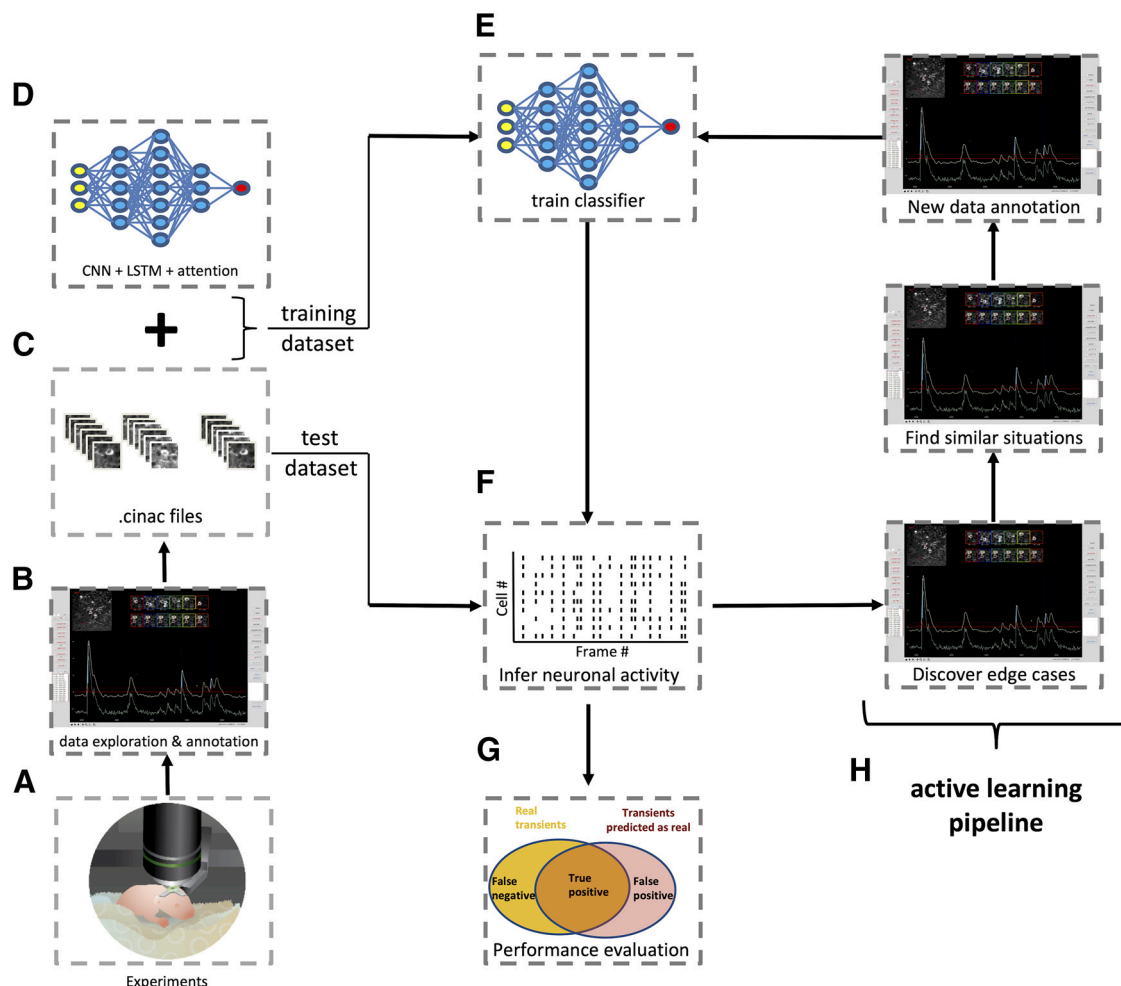


Figure 5. DeepCINAC step by step workflow. **A**, Schematic of two-photon imaging experiment. **B**, Screenshot of DeepCINAC GUI used to explore and annotate data. **C**, The GUI produces .cinac files that contain the necessary data to train or benchmark a classifier. **D**, Schematic representation of the architecture of the model that will be used to train the classifier and predict neuronal activity. **E**, Training of the classifier using the previously defined model. **F**, Schematic of a raster plot resulting from the inference of the neuronal activity using the trained classifier. **G**, Evaluation of the classifier performance using precision, sensitivity and F1 score. **H**, Active learning pipeline: screenshots of the GUI used to identify edge cases where the classifier wrongly infers the neuronal activity and annotate new data on similar situations to add data for a new classifier training.

Toolbox and data availability

The source code is available on GitLab (<https://gitlab.com/cossartlab/deepcinac>). The page includes a full description of the method, a user manual, tutorials and test data, as well as the settings used. A notebook configured to work on Google Colab is also provided, allowing for the classifier to run online, thus avoiding installing the necessary environment and providing a free GPU. The toolbox has been tested on windows (v7 Pro), Mac Os X (MacOS Mojave), and Linux Ubuntu (v.18.04.1).

Results

Validation of visual ground truth

As a first step, we asked whether the visualization of fluorescent transients was a good estimation of spiking activity present in a neuron. To do so, we used previously published data combining loose seal cell attached

recordings with two-photon calcium imaging (Chen et al., 2013; GENIE Project, 2015). We compared the visual ground truth to the “true” spiking of the cell. We found that visual inspection of calcium imaging movies allows the detection of 87.1%, 79.1%, and 80.7% true transients (i.e., spike associated transient) for each human expert respectively (median sensitivity; Fig. 6A). Among visually detected transients, 98.7%, 98.6%, and 98.6% were true transients for each human expert respectively (median precision; Fig. 6B). The F1 scores that combine these two previous metrics were 84.1%, 81.5%, and 85.9% for each human expert, respectively (median value; Fig. 6C). We evaluated the classifier CINAC_v6 trained with some recordings of “Visual-ctx-6s” and “Hippo-dvt” (Extended Data Table 1-1). We found that it allows the detection of 94% of the true transients (median sensitivity; Fig. 6A). Among predicted transients, 94.2% were true transients (median precision; Fig. 6B). F1 score was 94.7% (median value; Fig. 6C). Overall, we conclude that in absence of

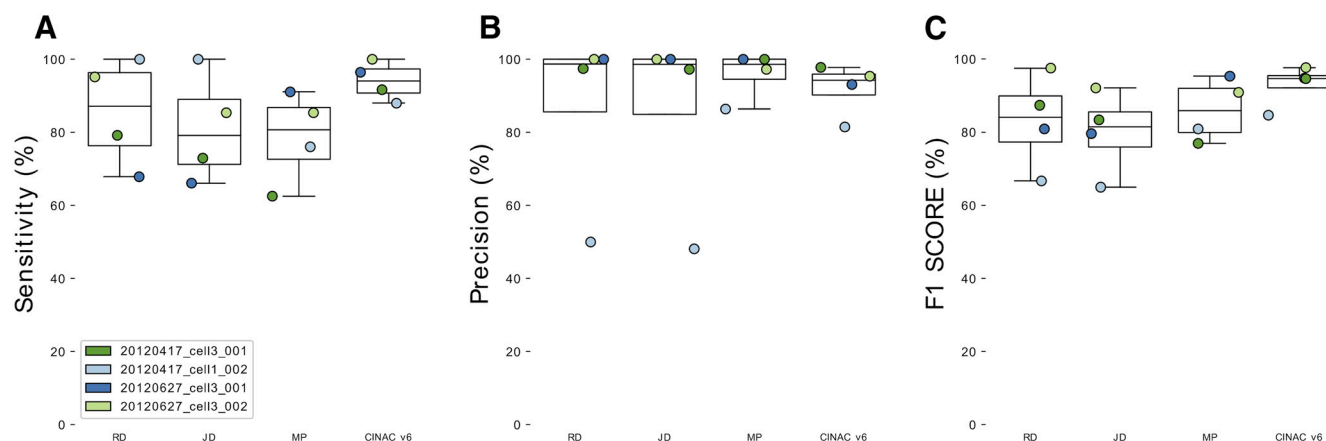


Figure 6. Validation of visual ground truth and deep learning approach. **A**, Boxplots showing sensitivity for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.) and CINAC_v6 evaluated against the known ground truth from four cells from the GENIE project. **B**, Boxplots showing precision for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.) and CINAC_v6 evaluated against the known ground truth from four cells from the GENIE project. **C**, Boxplots showing F1 score for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.) and CINAC_v6 evaluated against the known ground truth from four cells from the GENIE project. Each colored dot represents a cell. Cell labels in the legend correspond to session identifiers from the dataset. CINAC_v6 is a classifier trained on data from the GENIE project and the Hippo-dvt dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1).

patch-clamp-based ground truth, the visual inspection of the movie provides a good estimation of neuronal activity and that deep learning approach based on movie visualization can reach the human level in estimating cell activations.

DeepCINAC performance evaluation on developing hippocampus dataset

Comparing DeepCINAC against CalmAn and human level

We compared the performance of DeepCINAC and CalmAn (Pnevmatikakis et al., 2016), a well-established algorithm to infer neuronal activity, against the visual ground truth on CA1 hippocampus data during development (Hippo-dvt). We first evaluated DeepCINAC (CINAC_v1) on 20 putative pyramidal neurons and five interneurons (Fig. 7). The median sensitivity was 80.3% (interquartile range 75–94.5; Fig. 7A), the median precision was 90.8% (interquartile range 81.2–95.5; Fig. 7B), and the median F1 score was 86.3% (interquartile range 78.9–91.3; Fig. 7C).

We next evaluated CalmAn on the same cells using the same metrics. The median sensitivity was 60.6% (interquartile range 45.6–76; Fig. 7A), the median precision was 100% (interquartile range 93.8–100; Fig. 7B). The median F1 score was 70.1% (interquartile range 62.6–81.6; Fig. 7C), which was significantly lower than CINAC_v1 F1 score (Wilcoxon signed-rank test, $T=50$ and $p=0.002$). Finally, we asked whether DeepCINAC could perform as well as human “experts.” The median CINAC_v1 F1 score on the 15 cells annotated by the two human experts (J.D. and R.F.D.) was 88.2% (interquartile range 78.3–92), which was significantly lower than R.F.D. and J.D. F1 scores ($F1=95.2\%$, $T=4$, $p=0.002$ and $F1=96.8\%$, $T=22$, $p=0.031$, respectively; Extended Data Fig. 7-1A). However, on six cells annotated by M.A.P., CINAC_v1 and M.A.P. F1 scores were close ($F1=84.3\%$ and $F1=86.4\%$, respectively; Extended Data Fig. 7-1B).

Although DeepCINAC is still not at the ground truth level (combination of triple human labeling), it approximates human level.

Specific handling of overlap

One important characteristic of data from the developing CA1 region of the hippocampus is the high density of active neurons that can lead to overlap. This overlap between cells leading to false transients was pointed out as a specific issue in the analysis of calcium traces from a demixing (Gauthier et al., 2018). We asked whether the classifier would be able to distinguish real transients from increases in fluorescence because of the activity of an overlapping cell. Based on the visual inspection of imaged fields of view with numerous overlaps, we chose to specifically test the algorithm on calcium imaging data containing 391 cells segmented using CalmAn. Among those cells, we detected a total of 426 transients (fluorescence rise time) from 23 cells that were likely because of overlapping activity from a neighboring cell (see method for overlap activity detection). Among those transients, 98.6% were correctly classified as false by CINAC_v1 (general classifier), 93.2% were correctly classified as false by the CINAC_v7 (interneuron specific classifier), and 93.2% were correctly classified as false by CalmAn. We next asked whether the results could be improved by the use of another segmentation method. To do so, we performed the same analysis on the exact same field of view using the classifier prediction on the segmented cells obtained from suite2p (Pachitariu et al., 2017). Among a total of 480 cells, a total of 2718 transients from 101 cells were likely because of the activation of an overlapping cell, 99.1% of them were correctly classified as false by CINAC_v1.

Onset to peak prediction

Since we aimed at predicting as active all the frames included in the full rise time of the calcium transient (from

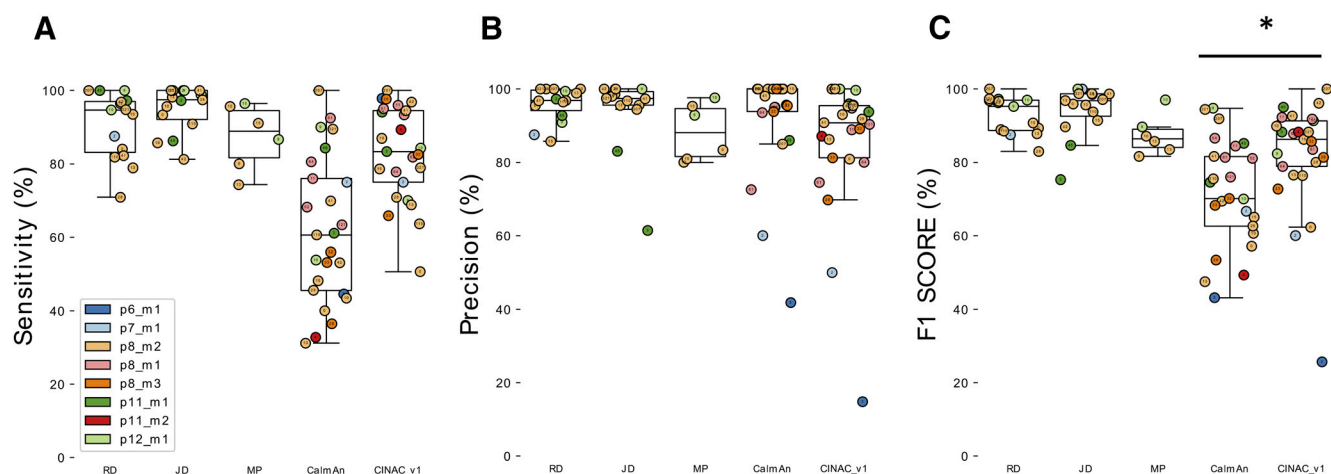


Figure 7. Evaluation of CINAC_v1 performance on Hippo-dvt dataset. **A**, Boxplots showing sensitivity for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.), CalmAn and CINAC_v1 evaluated against the visual ground truth of 25 cells. A total of 15 cells were annotated by J.D. and R.F.D., six by M.A.P. **B**, Boxplots showing precision for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.), CalmAn and CINAC_v1 evaluated against the visual ground truth of 25 cells. A total of 15 cells were annotated by J.D. and R.F.D., six by M.A.P. **C**, Boxplots showing F1 score for the three human experts (R.F.D., J.D., M.A.P.), CalmAn and CINAC_v1 evaluated against the visual ground truth of 25 cells. A total of 15 cells were annotated by J.D. and R.F.D., six by M.A.P. Each colored dot represents a cell, the number inside indicates the cell's id and each color represents a session as identified in the legend. CINAC_v1 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1). Figure 7 is supported by Extended Data Figures 7-1, 7-2. * $p < 0.05$.

onset to peak), we looked at the proportion of frames predicted as active in real transients. Using the general classifier (CINAC_v1), the median ratio of frames predicted among each real transient was 85.7% (interquartile range 70–100) for the 20 putative pyramidal cells and the five putative interneurons (Extended Data Fig. 7-2). We demonstrated that CINAC_v1 allows the detection of cell activation all along the rise time, giving us both the onset of cell activation and the duration of the rise time (Extended Data Fig. 7-2).

Classifier generalization and specialization

DeepCINAC performances on other datasets

A major aspect to consider in the development of algorithms to infer neuronal activity from calcium imaging data is the ability to be easily scalable to the wide variety of datasets (i.e., different indicators, different brain regions, ...).

We investigated the extent to which DeepCINAC (CINAC_v1) that was trained on data from the developing hippocampus would perform on other datasets (Extended Data Fig. 8-1). To answer that question, we used (1) GECO imaging movies (Hippo-GECO, 5 Hz, 2 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; Extended Data Fig. 8-1A), (2) GCaMP6m imaging movies (Hippo-6m, 10 Hz, 2 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; Extended Data Fig. 8-1B) both from the adult hippocampus, (3) GCaMP6s calcium imaging movies from the developing barrel cortex (Barrel-ctx-6s, 1.5 Hz, 1.2 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; Extended Data Fig. 8-1C; Modol et al., 2020), (4) GCaMP6s calcium imaging movies of interneurons from the developing hippocampus ("Hippo-dvt-INS," 10 Hz, 2 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; Extended Data Fig. 8-1D) and GCaMP6s recordings from the adult visual cortex (Visual-ctx-6s, downsampled 10 Hz, rescaled 1.2 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, see Materials and Methods; Extended Data Fig. 8-2). We show that DeepCINAC performs well on

Hippo-6m and Barrel-ctx-6s data. On Hippo-6m, F1 scores were 66.7% and 70.9% for CalmAn and CINAC_v1, respectively (Extended Data Fig. 8-1B, bottom panel). On Barrel-ctx-6s, F1 scores were 54.3% and 76.4% for CalmAn and CINAC_v1, respectively (Extended Data Fig. 8-1C, bottom panel). However, CINAC_v1 does not generalize well enough to infer activity on the Hippo-GECO recordings (F1 score = 44.2%; Extended Data Fig. 8-1A) neither on Visual-ctx-6s (F1 score = 69.9%; Extended Data Fig. 8-1C).

To overcome these poor performances on Hippo-GECO and Visual-ctx-6s and to improve performances on Barrel-ctx-6s and Hippo-6m datasets, we considered two strategies. The first one consists in training a classifier specific to the data. The second one consists in adding part of the new data to the large database to improve the classifier ability to generalize (Fig. 8; Extended Data Fig. 8-1).

Since our performances were low using CINAC_v1, we adopted the first strategy to improve the classifier on Hippo-GECO and Visual-ctx-6s datasets. We used part of these datasets to train specific classifiers and evaluate them on the remaining data (Extended Data Table 1-1). First, we observed that the Hippo-GECO-specific classifier (i.e., CINAC_v3) performed better than CINAC_v1 and CalmAn (CINAC_v3 median F1 score = 69.6%, CINAC_v1 median F1 score = 12.9%, and CalmAn median F1 score = 63.5%; Fig. 8A, bottom panel). This increase in F1 score from CINAC_v1 to CINAC_v3 was because of an increase in the sensitivity of the classifier (CINAC_v1 median sensitivity = 10%, CINAC_v3 median sensitivity = 70.3%; Fig. 8A, top panel) with a moderate loss in precision (CINAC_v1 median precision = 95%, CINAC_v3 median precision = 81.2%; Fig. 8A, middle panel). Second, we showed that the Visual-ctx-6s datasets specific

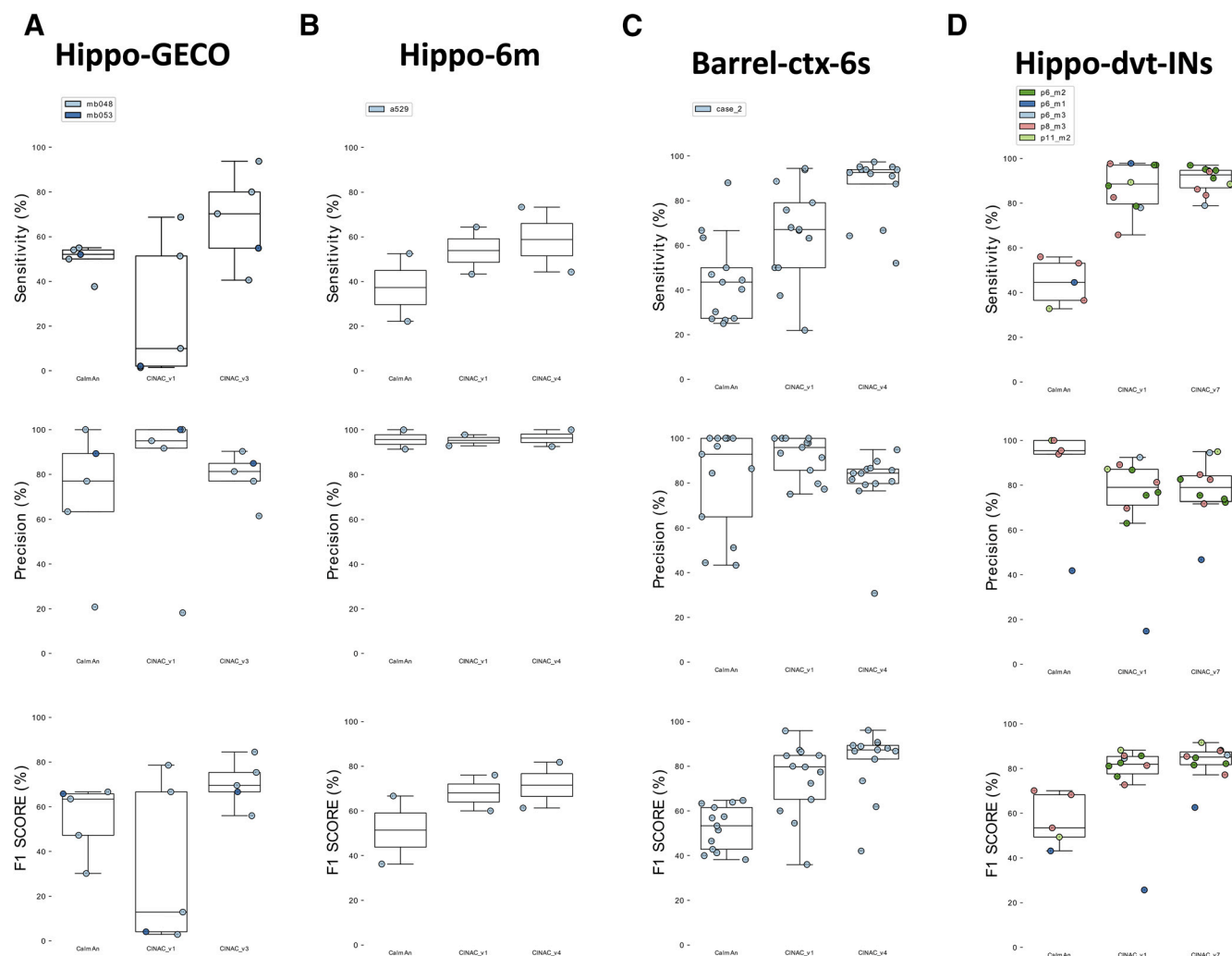


Figure 8. Use of DeepCINAC classifiers to optimize performances on various dataset. **A**, Boxplot displaying the sensitivity (top panel), precision (middle panel) and F1 score (bottom panel) for Hippo-GECO dataset. For each panel, we evaluated CalmAn performance as well as two different versions of CINAC (v1 and v3). CINAC_v1 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt dataset and CINAC_v3 is a classifier trained on data from the Hippo-GECO dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1). **B**, Boxplot displaying the sensitivity (top panel), precision (middle panel) and F1 score (bottom panel) for Hippo-6m dataset. For each panel, we evaluated CalmAn performance as well as two different versions of CINAC (v1 and v4). CINAC_v1 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt dataset and CINAC_v4 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt, Hippo-6m, and Barrel-ctx-6s dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1). **C**, Boxplot displaying the sensitivity (top panel), precision (middle panel) and F1 score (bottom panel) for Barrel-ctx-6s dataset. For each panel, we evaluated CalmAn performance as well as two different versions of CINAC (v1 and v4). CINAC_v1 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt dataset and CINAC_v4 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt, Hippo-6m, and Barrel-ctx-6s dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1). **D**, Boxplot displaying the sensitivity (top panel), precision (middle panel) and F1 score (bottom panel) for Hippo-dvt-INs dataset. For each panel, we evaluated CalmAn performance as well as two different versions of CINAC (v1 and v7). CINAC_v1 is a classifier trained on data from the Hippo-dvt dataset and CINAC_v7 is a classifier trained on interneurons from the Hippo-dvt dataset (Table 1; Extended Data Table 1-1). Each colored dot represents a cell, the number inside indicates the cell's id and each color represents a session as identified in the legend. Figure 8 is supported by Extended Data Figures 8-1, 8-2, 8-3.

classifiers (i.e., CINAC_v5 and CINAC_v6) performed better than CINAC_v1 and CalmAn (CINAC_v1 median F1 score = 69.9%, CINAC_v5 median F1 score = 73.9%, and CINAC_v6 median F1 score = 94.7%; Extended Data Fig. 8-2C). Because CINAC_v5 was trained exclusively on labeled data from the Visual-ctx-6s dataset, it allows an increase in the classifier sensitivity (CINAC_v1 median sensitivity = 59.2%, CINAC_v5 median sensitivity = 100%; Extended Data Fig. 8-2A). However, this increase was achieved at the cost of a

reduced precision (CINAC_v1 median precision = 96.2%, CINAC_v5 median precision = 59%; Extended Data Fig. 8-2B), and overall a slight increase in the F1 score (Extended Data Fig. 8-2C). To improve the performance on this dataset, we extended the CINAC_v5 training set with four cells from the Hippo-dvt to train CINAC_v6. This allows us to increase both sensitivity (CINAC_v6 median sensitivity = 94%) and precision (CINAC_v6 median precision = 94.2%) of the classifier, leading to a large improvement of the F1 score (CINAC_v6

median F1 score = 94.7%; Extended Data Fig. 8-2C). In a nutshell, when the dataset to analyze has different calcium dynamics, a new classifier specifically trained on this dataset would reach higher performance than CINAC_v1.

On the datasets from the adult hippocampus (Hippo-6m) and developing barrel cortex (Barrel-ctx-6s), since CINAC_v1 performances were close to the performance reached on Hippo-dvt dataset, we considered the second strategy. We extended the CINAC_v1 training dataset with labeled data from Hippo-6m and Barrel-ctx-6s datasets and trained a new classifier (CINAC_v4). First, we observed that on the Hippo-6m dataset, CINAC_v4 classifier has better sensitivity and precision than CINAC_v1 and CalmAn (CINAC_v1 median sensitivity = 53.8%, CINAC_v4 median sensitivity = 58.7%, CalmAn median sensitivity = 37.3%, CINAC_v1 median precision = 95.3%, CINAC_v4 median precision = 96.2%, CalmAn median precision = 95.7%, CINAC_v1 median F1 score = 68%, CINAC_v4 median F1 score = 71.6%, CalmAn median F1 score = 51.4%; Fig. 8B). Second, we found that on Barrel-ctx-6s dataset, CINAC_v4 classifier performed better than CINAC_v1 and CalmAn (CINAC_v4 F1 score = 87.3%, CINAC_v1 F1 score = 79.7%, CalmAn F1 score = 53.3%; Fig. 8C, bottom panel). This increase in F1 score from CINAC_v1 to CINAC_v4 was because of an increase in the sensitivity of the classifier (CINAC_v4 median sensitivity = 92.6%, CINAC_v1 median sensitivity = 67.1%, CalmAn median sensitivity = 43.5%; Fig. 8C, top panel) with a moderate loss in precision (CINAC_v4 median precision = 84.3%, CINAC_v1 median precision = 95.9%, CalmAn median precision = 92.9%; Fig. 8C, middle panel). Overall, we confirm here that adding part of a new dataset to the training set of CINAC_v1 classifier allows us to improve the performance on this new dataset. Thus, one could use the training dataset of CINAC_v1 and add part of a new dataset to train a classifier that would achieve better performance than CINAC_v1 on this new data.

Because we benefited from already published data from our group (Barrel-ctx-6s), we next asked whether we could arrive at the same conclusion using CINAC_v1. We used the activity inferred by CINAC_v1 on this data and performed assemblies detection analysis as described previously (Modol et al., 2020). We found the same number of assemblies as the original analysis (Extended Data Fig. 8-3A,B, first two panels), as well as the same topographic organization (Extended Data Fig. 8-3A,B, bottom panels). We confirmed that the assemblies detected by either CalmAn or CINAC_v1 were composed of similar cells (Extended Data Fig. 8-3C).

DeepCINAC performances on different cell types

A second important aspect to infer neuronal activity from calcium imaging movies is the variety of cell types recorded in the same field of view (e.g., interneuron and pyramidal cells). In recordings from the hippocampus, we observed that most interneurons have very different calcium dynamics than pyramidal cells (higher fluorescence signal followed by a plateau). Because CINAC_v1 was mainly trained on the activity of pyramidal cells, we suspected that it would not provide accurate inference on interneurons. Using the GUI, we verified its prediction on

Table 2: Cell type prediction confusion matrix

		Ground truth		
		Pyramidal cell	Interneuron	Noise
Prediction	Pyramidal cell	46	5	0
	Interneuron	1	31	2
	Noise	4	2	9

Confusion matrix, representing the number of true positives, true negatives, false positives, and false negatives. Ground truth refers to the manually detected interneurons and pyramidal cells. Prediction refers to the type predicted by the classifier for the same cells.

interneurons and concluded that they were not always optimal (Extended Data Fig. 8-1D). To improve activity inference on interneurons, we trained an interneuron specific classifier. In more detail, the precision of the inference was similar for CINAC_v1 and CINAC_v7 (CINAC_v1 median precision = 79%, CINAC_v7 median precision = 78.9%; Fig. 8D, top panel). However, CINAC_v7 provides more sensitive inference (CINAC_v1 median sensitivity = 88.6%, CINAC_v7 median sensitivity = 92.6%; Fig. 8D, middle panel). As a result, the specific classifier performed better than the general one on interneurons (CINAC_v1 median F1 score = 81.9%, CINAC_v7 median F1 score = 85.1%; Fig. 8D, bottom panel).

Cell type inference using DeepCINAC

Recently, a deep-learning method using a similar model to DeepCINAC was proposed to differentiate cell types (Troullinou et al., 2019). This model was based on the analysis of fluorescence traces from various cell types and automatically classified imaged cells in different types. We asked whether DeepCINAC would be able to distinguish interneurons from pyramidal cells using as input the calcium imaging movie rather than the fluorescence trace. Additionally, we added a noise category in the training dataset allowing us to automatically discard cells. We achieved a general F1 score of 86%. We had a sensitivity of 90.2%, 81.6%, and 81.8% and a precision of 90.2%, 91.2%, and 60% for pyramidal, interneuron, and noisy cells, respectively (Table 2).

Since activity inference performance using DeepCINAC depends on the cell type, we perform this cell type prediction before activity inference. During the activity inference of a movie DeepCINAC can be configured to switch between different activity classifiers depending on the type of the cell to predict.

Discussion

Deep learning-based method(s) to infer neuronal activity from two-photon calcium imaging datasets use cellular fluorescence signals as inputs. Here, we propose a method based on the visual inspection of the recordings. We will discuss the advantages and limitations of this approach.

Using the movie dynamics, we benefited from all the information available in the calcium imaging movie. This approach allowed us to not rely on a demixing algorithm to produce the neuron's traces. Instead, by working directly on the raw calcium imaging movie, the algorithm has

learned to identify a transient and distinguish overlap activity from a real transient. DeepCINAC achieves better performance than CalmAn and is able to achieve human performance level on some fields of view and cells.

Additionally, we show that a classifier trained on a specific dataset (“Hippo-dvlt-6s”) is able to generalize to other datasets (Hippo-6m and Barrel-ctx-6s). DeepCINAC allows training of flexible classifiers whose generalization on new datasets can be improved by adding part of this new dataset to the training (at the cost of slightly reduced performance of the classifier on original data). However, we show that generalization is not always achieved such as in the case of a classifier trained on Hippo-dvt data and used to predict activity on some very different datasets (Hippo-GECO and Visual-ctx-6s). This is likely explained by the difference in calcium indicator, imaging rate, and imaging resolution. We demonstrated that this limitation can be circumvented by training specific classifiers. Overall, this approach allowed us to create classifiers that scale to different developmental stages (from P5 to adult), different types of neurons (pyramidal cells and interneurons), as well as different indicators (GCaMP6s, GCaMP6m, GECO).

Analysis of calcium imaging data may be impacted by some factors: (1) small amplitude transients, (2) transients occurring during the decay of another one, (3) summations, and (4) X and Y movement or neuropil activation. Users can evaluate the impact of those factors through visual inspection of the inferred activity using the deepCINAC GUI.

Finally, we explored the range of values of hyperparameters to optimize the accuracy of the classifier. Labeling data are time consuming, but the training does not need any parameters tuning and the prediction is straight forward. Neither tedious manual tuning of parameters is required, nor a GPU on a local device because we provide a notebook to run predictions on Google Colab (see Materials and Methods). Predictions are fast, with a runtime of around 10 s by cell for 12,500 frames, meaning <3 h for 1000 cells. However, a GPU would be necessary to train the network on a big dataset.

Already widely used by many calcium imaging labs (Driscoll et al., 2017; Gauthier and Tank, 2018; Katlowitz et al., 2018; Andalman et al., 2019), CalmAn offers a performing and functional analysis pipeline. Although the complex fine tuning of CalmAn parameters on the dataset might lead to a suboptimal spike inference from the model, we decided to compare CalmAn against our ground truth.

The benchmarks remain limited to a small number of cells for which we established a ground truth and may be extended to more cells. Notably, a future approach could be to use more realistic simulated data such as done in a recent work (Charles et al., 2019).

In the model we used, each cell was represented by a segment of the field of view, in our case a 25×25 pixel ($50 \times 50 \mu\text{m}$) window that allows complete coverage of the cell fluorescence and potential overlapping cells. Consequently, the network is able to generalize its prediction to recordings acquired with this resolution ($2 \mu\text{m}/$

pixel). However, to be efficient on another calcium imaging dataset with a different resolution it would be necessary to train a new classifier adjusting the window size accordingly. Importantly, we trained the model on a selection of cells with valid segmentations; meaning that a cell is not represented by several contours. The inference performance of the classifier might decrease on cells whose segmentation was not properly achieved.

Since precise spike inference cannot be experimentally assessed on the data, we chose to infer the activity of the cell defined by the fluorescence rise time instead of inferring the spikes. However, with a ground truth based on patch-clamp recordings, we could adapt this method to switch from a binary classification task to a regression task, predicting the number of spikes at each frame.

Conclusion

We built DeepCINAC basing the ground truth on visual inspection of the movie and training the classifier on movie segments. DeepCINAC offers a flexible, fast, and easy-to-use toolbox to infer neuronal activity from a variety of two-photon calcium imaging dataset, reaching human level performance. It provides the tools to measure its performance based on human evaluation. Currently, DeepCINAC provides several trained classifiers on CA1 two-photon calcium imaging at early postnatal stages; its performance might still be improved with more labeled data. In the future, we believe that a variety of classifiers collaboratively trained for specific datasets should be available to open access.

References

- Allene C, Picardo MA, Becq H, Miyoshi G, Fishell G, Cossart R (2012) Dynamic changes in interneuron morphophysiological properties mark the maturation of hippocampal network activity. *J Neurosci* 32:6688–6698.
- Andalman AS, Burns VM, Lovett-Barron M, Broxton M, Poole B, Yang SJ, Grosenick L, Lerner TN, Chen R, Benster T, Mourrain P, Levoy M, Rajan K, Deisseroth K (2019) Neuronal dynamics regulating brain and behavioral state transitions. *Cell* 177:970–985.e20.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303–325.
- Berens P, Freeman J, Deneux T, Chenkov N, McColgan T, Speiser A, Macke JH, Turaga SC, Mineault P, Rupprecht P, Gerhard S, Friedrich RW, Friedrich J, Paninski L, Pachitariu M, Harris KD, Bolte B, Machado TA, Ringach D, Stone J, et al. (2018) Community-based benchmarking improves spike rate inference from two-photon calcium imaging data. *PLoS Comput Biol* 14:e1006157.
- Bin Y, Yang Y, Shen F, Xie N, Shen HT, Li X (2019) Describing video with attention-based bidirectional LSTM. *IEEE Trans Cybern* 49:2631–2641.
- Charles AS, Song A, Gauthier JL, Pillow JW, Tank DW (2019) Neural anatomy and optical microscopy (NAOMi) simulation for evaluating calcium imaging methods. *bioRxiv* 726174. doi: <https://doi.org/10.1101/726174>.
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295–300.
- Chollet F (2015) Keras. Available at <https://keras.io>.

- Dombeck DA, Harvey CD, Tian L, Looger LL, Tank DW (2010) Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci* 13:1433–1440.
- Driscoll LN, Pettit NL, Minderer M, Chettih SN, Harvey CD (2017) Dynamic reorganization of neuronal activity patterns in parietal cortex. *Cell* 170:986–999.e16.
- Evans MH, Petersen RS, Humphries MD (2019) On the use of calcium deconvolution algorithms in practical contexts. *bioRxiv* 871137. doi: <https://doi.org/10.1101/871137>.
- Galli L, Maffei L (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242:90–91.
- Gauthier JL, Tank DW (2018) A dedicated population for reward coding in the hippocampus. *Neuron* 99:179–193.
- Gauthier JL, Koay SA, Nieh EH, Tank DW, Pillow JW, Charles AS (2018) Detecting and correcting false transients in calcium imaging. *bioRxiv* 473470. doi: <https://doi.org/10.1101/473470>.
- GENIE Project (2015) Simultaneous imaging and loose-seal cell-attached electrical recordings from neurons expressing a variety of genetically encoded calcium indicators. Available at <http://CRCNS.org>.
- Géron A (2019) Hands-on machine learning with scikit-learn, Keras, and TensorFlow: concepts, tools, and techniques to build intelligent systems. Sebastopol: O'Reilly Media.
- Giovannucci A, Friedrich J, Gunn P, Kalfon J, Brown BL, Koay SA, Taxis J, Najafi F, Gauthier JL, Zhou P, Khakh BS, Tank DW, Chklovskii DB, Pnevmatikakis EA (2019) CalmAn an open source tool for scalable calcium imaging data analysis. *Elife* 8:e38173.
- Hochreiter S, Schmidhuber J (1997) Long short-term memory. *Neural Comput* 9:1735–1780.
- Katlowitz KA, Picardo MA, Long MA (2018) Stable sequential activity underlying the maintenance of a precisely executed skilled behavior. *Neuron* 98:1133–1140.e3.
- Kim JY, Ash RT, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Golde TE, Smirnakis SM, Jankowsky JL (2013) Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualising and manipulating neuronal circuits in vivo. *Eur J Neurosci* 37:1203–1220.
- Kim JY, Grunke SD, Levites Y, Golde TE, Jankowsky JL (2014) Intracerebroventricular viral injection of the neonatal mouse brain for persistent and widespread neuronal transduction. *J Vis Exp* (91):51863.
- LeCun Y, Bengio Y (1995) Convolutional networks for images, speech, and time series. *Handb Brain Theory Neural Netw* (Arbib MA ed). Cambridge, MA: MIT Press.
- Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, Monyer H (2012) Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 335:1506–1510.
- Miri A, Daie K, Arrenberg AB, Baier H, Aksay E, Tank DW (2011) Spatial gradients and multidimensional dynamics in a neural integrator circuit. *Nat Neurosci* 14:1150–1159.
- Modol L, Bollmann Y, Tressard T, Baude A, Che A, Duan ZRS, Babij R, García NVDM, Cossart R (2020) Assemblies of perisomatic GABAergic neurons in the developing barrel cortex. *Neuron* 105:93–105.e4.
- O'Donovan MJ (1989) Motor activity in the isolated spinal cord of the chick embryo: synaptic drive and firing pattern of single motoneurons. *J Neurosci* 9:943–958.
- Pachitariu M, Stringer C, Dipoppa M, Schröder S, Rossi LF, Dalgleish H, Carandini M, Harris KD (2017) Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/061507>.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, Vanderplas J, Passos A, Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay É (2011) Scikit-learn: machine learning in Python. *J Mach Learn Res* 12:2825–2830.
- Perez L, Wang J (2017) The effectiveness of data augmentation in image classification using deep learning. *ArXiv* 1712.04621.
- Pnevmatikakis EA, Soudry D, Gao Y, Machado TA, Merel J, Pfau D, Reardon T, Mu Y, Lacefield C, Yang W, Ahrens M, Bruno R, Jessell TM, Peterka DS, Yuste R, Paninski L (2016) Simultaneous denoising, deconvolution, and demixing of calcium imaging data. *Neuron* 89:285–299.
- Provine RR (1972) Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Res* 41:365–378.
- Ramachandran P, Zoph B, Le QV (2017) Searching for activation functions. *ArXiv* 1710.05941.
- Rémy P (2019) philipperemy/keras-attention-mechanism. Available at <https://github.com/philipperemy/keras-attention-mechanism>.
- Rübel O, Tritt A, Dichter B, Braun T, Cain N, Clack N, Davidson TJ, Dougherty M, Fillion-Robin J-N, Graddis N, Grauer M, Kiggins JT, Niu L, Ozturk D, Schroeder W, Soltesz I, Sommer FT, Svoboda K, Lydia N, Frank LM et al. (2019) NWB: n 2.0: an accessible data standard for neurophysiology. *bioRxiv* 523035. doi: <https://doi.org/10.1101/523035>.
- Srivastava N, Hinton G, Krizhevsky A, Sutskever I, Salakhutdinov R (2014) Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting. *J Mach Learn Res* 15:1929–1958.
- Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz N, Reddy CB, Carandini M, Harris KD (2019) Spontaneous behaviors drive multidimensional, brainwide activity. *Science* 364:255–255.
- Teeters JL, Godfrey K, Young R, Dang C, Friedsam C, Wark B, Asari H, Peron S, Li N, Peyrache A, Denisov G, Siegle JH, Olsen SR, Martin C, Chun M, Tripathy S, Blanche TJ, Harris K, Buzsáki G, Koch C, et al. (2015) Neurodata without borders: creating a common data format for neurophysiology. *Neuron* 88:629–634.
- Troullinou E, Tsagkatakis G, Chavlis S, Turi G, Li W-K, Losonczy A, Tsakalides P, Poirazi P (2019) Artificial neural networks in action for an automated cell-type classification of biological neural networks. *arXiv:1911.09977 [cs, q-bio]*.
- Vaswani A, Shazeer N, Parmar N, Uszkoreit J, Jones L, Gomez AN, Kaiser Ł, Polosukhin I (2017) Attention is all you need. In *Advances in Neural Information Processing Systems*, pp. 6000–6010.
- Villette V, Malvache A, Tressard T, Dupuy N, Cossart R (2015) Internally recurring hippocampal sequences as a population template of spatiotemporal information. *Neuron* 88:357–366.
- Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, et al. (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* 17:261–272.

1.2 Article expérimental : Dard R.F. et al

Titre: “The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion”

Auteurs: Robin F. Dard, Erwan Leprince, Julien Denis, Shrisha Rao-Balappa, Dmitrii Suchkov, Richard Boyce, Catherine Lopez, Marie Giorgi-Kurz, Tom Szwagier, Théo Dumont, Hervé Rouault, Marat Minlebaev, Agnes Baude, Rosa Cossart, Michel Picardo

Publication : eLife. (2022).

A- Résumé

Nous avons décrit l'activité de réseau de la région CA1 de l'hippocampe lors des deux premières semaines de vie postnatale de la souris et montré que lors de la première semaine de vie, l'activité des neurones dans la couche pyramidale de la région CA1 s'organise en événements coordonnant l'activité d'un grand nombre de neurones. De plus, en accord avec des études précédentes (Mohs and Blumberg, 2010; Valeeva et al, 2019), ces activations synchrones seraient déclenchées par des twitches myocloniques, mouvements caractéristiques de l'animal lors du sommeil actif. De façon complémentaire, nous avons observé que lors de cette phase précoce du développement, la majorité des cellules enregistrées avaient une activité significativement associée au mouvement de l'animal. En revanche, dès le début de la deuxième semaine de vie, nous avons montré que l'activité devenait continue et négativement modulée par les mouvements de l'animal. Au même moment, nous avons aussi observé que l'activité neuronale qui était déclenchée par le mouvement s'en détache et en devient indépendante. Nous avons ainsi mis en évidence une transition développementale rapide dans l'activité du réseau de neurones de la région CA1 de l'hippocampe au début de la deuxième semaine de vie postnatale. Afin de comprendre les circuits et mécanismes impliqués dans cette transition, nous avons émis l'hypothèse que cette diminution de l'activité suite au mouvement après la première semaine de vie serait due à l'activité inhibitrice des interneurons GABAergiques. Nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel des interneurons de CA1 dans cette transition. Premièrement, d'un point de vue anatomique, nous avons observé un bourgeonnement massif et abrupt des axones GABAergiques innervant la couche pyramidale à partir de la deuxième semaine de vie. Deuxièmement, d'un point de vue fonctionnel, nous avons observé que, alors que les cellules pyramidales étaient activées par le mouvement lors de la première semaine de vie, puis inhibées lors de la seconde, les neurones GABAergiques ne suivaient pas ce changement puisque leur activité demeurait positivement corrélée au mouvement. Ces deux observations nous permettent de proposer que la maturation abrupte de l'innervation inhibitrice périssomatique en début de deuxième semaine postnatale serait responsable de la transition observée au niveau de l'activité de réseau. Grâce à la modélisation d'un réseau de neurones contenant des neurones excitateurs et inhibiteurs nous avons pu montrer que l'émergence de l'inhibition pouvait expliquer la transition observée.

B- Article

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.08.447542v1>

1 **TITLE:**

2 The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-
3 motion

4 **AUTHORS:**

5 Robin F. Dard¹, Erwan Leprince¹, Julien Denis¹, Shrisha Rao-Balappa², Dmitrii Suchkov¹, Richard
6 Boyce¹, Catherine Lopez¹, Marie Giorgi-Kurz¹, Tom Szwagier^{1,3}, Theo Dumont^{1,3}, Hervé Rouault²,
7 Marat Minlebaev¹, Agnes Baude¹, Rosa Cossart^{1*}, Michel A. Picardo^{1*}

8 ¹ Aix Marseille Univ, INSERM, INMED (U1249), Turing Centre for Living systems, Marseille,
9 France

10 ² Aix-Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, CPT (UMR 7332), Turing Centre for Living
11 systems, Marseille, France

12 ³ Mines ParisTech, PSL Research University

13 * Correspondence: michel.picardo@inserm.fr and rosa.cossart@inserm.fr

14 **ABSTRACT:**

15 Early electrophysiological brain oscillations recorded in preterm babies and newborn rodents are
16 initially mostly driven by bottom-up sensorimotor activity and only later can detach from external
17 inputs. This is a hallmark of most developing brain areas including the hippocampus, which in the
18 adult brain, functions in integrating external inputs onto internal dynamics. Such developmental
19 disengagement from external inputs is likely a fundamental step for the proper development of
20 cognitive internal models. Despite its importance, the developmental timeline and circuit basis for this
21 disengagement remain unknown. To address this issue, we have investigated the daily evolution of
22 CA1 dynamics and underlying circuits during the first two postnatal weeks of mouse development
23 using two-photon calcium imaging in non-anesthetized pups. We show that the first postnatal week
24 ends with an abrupt shift in the representation of self-motion in CA1. Indeed, most CA1 pyramidal
25 cells switch from activated to inhibited by self-generated movements at the end of the first postnatal
26 week whereas the majority of GABAergic neurons remain positively modulated throughout this
27 period. This rapid switch occurs within two days and follows the rapid anatomical and functional
28 surge of local somatic GABAergic innervation. The observed change in dynamics is consistent with a
29 two-population model undergoing a strengthening of inhibition. We propose that this abrupt
30 developmental transition inaugurates the emergence of internal hippocampal dynamics.

33 **INTRODUCTION**

34 The adult hippocampus serves multiple cognitive functions including navigation and
 35 memory. These functions rely on the ability of hippocampal circuits to integrate external inputs
 36 conveying multi-sensory, proprioceptive, contextual and emotional information onto internally-
 37 generated dynamics. Therefore, the capacity to produce internally coordinated neuronal activity
 38 detached from environmental inputs is central to the cognitive functions of the hippocampus such as
 39 planning and memory (Buzsáki, 2015; Buzsáki and Moser, 2013). In contrast to the adult situation,
 40 the developing hippocampus, like many developing cortical structures, is mainly driven by bottom-up
 41 external environmental and body-derived signals, including motor twitches generated in the spinal
 42 cord and/or the brainstem (Dooley et al., 2020; Inácio et al., 2016; Karlsson et al., 2006; Mohs and
 43 Blumberg, 2010; Rio-Bermudez et al., 2020; Valeeva et al., 2019a). These produce early sharp waves
 44 conveyed by inputs from the entorhinal cortex (Valeeva et al., 2019a). The emergence of self-
 45 organized sequences without reliance on external cues in the form of sharp wave ripples (SWRs) is
 46 only observed after the end of the second postnatal week and sequential reactivations even a week
 47 later (Farooq and Dragoi, 2019; Muessig et al., 2019). Therefore, early hippocampal activity as
 48 measured with electrophysiological recordings is first externally-driven while the emergence of
 49 internal dynamics is protracted. The timing and the circuit mechanisms of the switch between motion-
 50 guided and internally produced hippocampal dynamics remain unknown. They have been proposed to
 51 rely on the maturation of CA3 and extrinsic hippocampal inputs, however, a possible role of local
 52 connectivity, in particular recurrent somatic inhibition cannot be excluded (Cossart and Khazipov,
 53 2021).

54 Local GABAergic interneurons could be critically involved in this phenomenon for several
 55 reasons. First, both theoretical and experimental work suggest that self-organized internal neuronal
 56 network dynamics require feedback connections to produce an emergent state of activity
 57 independently from the incoming input (Hopfield and Tank, 2005; Hopfield, 1982; Yuste, 2015).
 58 Feedback circuits are mainly GABAergic in CA1 (but not necessarily inhibitory), given the scarcity of
 59 recurrent glutamatergic connections in that hippocampal sub-region (Bezaire and Soltesz, 2013).
 60 Second, GABAergic interneurons, in particular the perisomatic subtypes, are long known to shape the
 61 spatial and temporal organization of internal CA1 dynamics (Buzsáki, 2015; Lee et al., 2014; Soltesz
 62 and Losonczy, 2018; Valero et al., 2015). However, GABAergic perisomatic cells display a delayed
 63 maturation profile both at structural (Jiang et al., 2001; Marty et al., 2002; Morozov and Freund,
 64 2003; Tyzio et al., 1999) and functional levels (Ben-Ari, 2002; Doischer et al., 2008; Jiang et al.,
 65 2001; Khazipov et al., 2004; Marty et al., 2002; Morozov and Freund, 2003; Murata and Colonnese,

2020; Tyzio et al., 1999), and the precise developmental timeline for their postnatal development remains unknown, partly due to the difficulty in labeling them (Donato et al., 2017) .

Here we investigate the evolution of CA1 dynamics during the first and second postnatal weeks of mouse development with an eye on the specific patterning of activity of CA1 GABAergic neurons. To this aim, we adapted two-photon calcium imaging of CA1 dynamics using virally-expressed GCaMP6 through a cranial window in non-anesthetized pups. We show that the first postnatal week ends with an abrupt switch in the representation of self-motion in CA1: principal neurons were synchronized by spontaneous movement before P9, whereas self-motion decreased their activity after that time point. Consistent with a two-population neuronal model, this switch was locally paralleled by the rapid anatomical and functional surge of somatic GABAergic interneurons and no significant change in external inputs. Self-generated bottom-up inputs may thus directly contribute to the emergence of somatic GABAergic inhibition and in this way calibrate local circuits to the magnitude of external inputs prior to the opening of experience-dependent plasticity.

RESULTS

Progressive evolution of CA1 neuronal dynamics

In order to induce stable and early expression of the calcium indicator protein GCaMP6s, pups were injected with the AAV1-hSyn-GCaMP6s.WPRE.SV40 virus in the brain lateral ventricle on the day of birth (P0, **Figure 1A** and **Figure 1 - figure supplement 1A**). Five to twelve days after injection, the hippocampal CA1 region of non-anesthetized pups was imaged through a window implant placed on the same day (**Figure 1A**, see **Methods**). We first quantified the amount of sleep/wake cycle in P5-6 mice after cranial window surgery and EMG nuchal electrodes implantation. We found that mice spent 74 (+/-6) % of their time in active sleep (**Figure 1 - figure supplement 1B**), which is comparable to previous reports (Jouvet-Mounier et al., 1969). This indicates that the window implant did not alter this characteristic of behavior at early postnatal stages. In the same way, the acute window implant did not significantly alter electrophysiological network patterns. These were measured using *in vivo* bilateral silicon probes recordings of early sharp waves (eSW, **Figure 1 - figure supplement 1C**, see **Discussion**) in P6-8 (n=4) and P11 (n=2) pups expressing GCaMP6s with a frequency of 2.6 eSW/min (25 % 1.15 eSW/min and 75 % 4.16 eSW/min) for the ipsilateral side and 3.49 eSW/min (25 % 1.96 eSW/min and 75 % 5.1 eSW/min, *p-value* = 0.39) for the contralateral side (**Figure 1 - figure supplement 1C**). This slight but non-significant reduction in eSW frequency recorded from the ipsilateral hemisphere was similarly reported in a previous study using the same surgical approach (see **Discussion**, Graf et al., 2021). eSW synchronization between hemispheres was preserved (Valeeva et al., 2019b) but with a 12 ms delay between the two hemispheres (peak at 0.087 +/- 0.027 s, **Figure 1 - figure supplement 1C**), possibly explained by a slight drop in local

temperature due to the chamber placement as described previously (Reig et al., 2010). Finally, we checked for the presence of other types of oscillations in both hemispheres and observed a peak in the theta range in the P11 mouse pups in both hemispheres (ipsi: peak at 4.3 Hz of amplitude $3.6 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$ mV²/Hz; contra: peak at 4.1 Hz of amplitude $2 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$ mV²/Hz (jackknife std), **Figure 1 - figure supplement 1C**). In general, a slight increase of the peak power of most electrophysiological network oscillations (below 20Hz) was observed (**Figure 1 - figure supplement 1C**). Altogether we can conclude that the presence of the window implant minimally disrupted the electrophysiological network patterns and sleep-wake cycle of developing rodents at that early postnatal period. Thus, we pursued the description of early multineuron CA1 dynamics using calcium imaging (62 imaging sessions, 35 mouse pups aged between 5 and 12 days, yielding a total of 33,412 cells, see **Table 1** for details on each session and their inclusion in the figures).

The contours of the imaged neurons and their calcium fluorescence events were extracted using Suite2P (Pachitariu et al., 2017) and DeepCINAC (Denis et al., 2020), respectively. Representative examples of fields of view, contour maps and activity raster plots from recordings in P5, P7, P10 and P12 mouse pups are shown in Figure 1A. Neuronal activity was stable over the duration of the recording (Figure 1 – figure supplement 1D, E – median change: 0.08 transients/minute, N=31). Consistent with previous electrophysiological studies (Leinekugel et al., 2002; Mohns and Blumberg, 2008; Valeeva et al., 2019a), spontaneous neuronal activity in the CA1 region of P5-6 pups alternated between recurring population bursts (Synchronous Calcium Events, SCEs), and periods of low activity (**Figure 1A**). In P5-6 mouse pups more than half of the detected calcium transients occurred within SCEs (P5: median value 55 % N=4, n=8; P6: median value 55 % N=3, n=5; N: mice, n: imaging sessions, **Figure 1B**). Activity then became progressively continuous as evidenced by the linear decrease in the proportion of calcium transients occurring during SCEs ($r^2=0.78$, $p<0.0001$) to finally reach 33 % in P12 mouse pups (P12: N=5, n=8, **Figure 1B**). Reminiscent of a transient period of ‘neural quiescence’ at the beginning of the second postnatal week (Dominguez et al., 2021), we observed a nonlinear evolution in the cell activation frequency with a local minimum around P10 ($r^2 = 0.30$, **Figure 1C**). We conclude that CA1 dynamics progressively evolve from discontinuous to continuous during the first two postnatal weeks, in agreement with previous electrophysiological studies (Cossart and Khazipov, 2021; Mohns and Blumberg, 2008; Valeeva et al., 2019a).

Early synchronous calcium events correlate with spontaneous motor activity

Previous extracellular electrophysiological recordings indicated that, in developing rodents, CA1 dynamics followed spontaneous motor activity during the first postnatal week (Karlsson et al., 2006; Rio-Bermudez et al., 2020; Valeeva et al., 2019a). Hence, we next examined the relationship between population activity and movement as monitored using either piezo recordings or infrared cameras (see **Methods**). Because our surgical procedure could potentially affect CA1 dynamics in response to contralateral movement, we computed peri-movement time histograms (PMTHTs) by plotting the fraction of active neurons centered on the onset of all ipsi or contralateral limbs movements. Both spontaneous limb movements were followed by an increase of CA1 activity (peak ipsi= 3.6 %, peak contra= 2.8 %, chance level 3.4 %, **Figure 1 - figure supplement 1E**), showing that the surgery was not preventing the hippocampal response to contralateral limb movements. Still, contralateral limb movements recruited a slightly lower fraction of active cells (see **Discussion**). In mouse pups younger than P9, movements were followed by a significant increase in the percentage of active cells exceeding the chance level (**Figure 2A**, P5-8 median above chance level, **Video 1-3**) and an increase of the average DF / F fluorescence signal (**Figure 2 - figure supplement 1A**). In contrast, after P9, movements were followed by a significant decrease of activity below chance level (**Figure 2A**, P10-12 median below chance level, **Video 4-6**) and a decreased DF / F fluorescence signal (**Figure 2 - figure supplement 1A**). Short myoclonic movements such as twitches, happening during periods of active sleep (Gramsbergen et al., 1970; Jouvet-Mounier and Astic, 1968; Karlsson et al., 2006) as opposed to longer movements, happening mostly during wakefulness, may induce different activity patterns in the hippocampus (Mohns and Blumberg, 2008). This difference between wake movements and active-sleep twitches during development is proposed to rely on a gating of sensory-feedback associated with movement during wake (Dooley and Blumberg, 2018; Tiriac and Blumberg, 2016). Accordingly, when combining calcium imaging with nuchal EMG recordings in one P5 mouse pup, we observed an increase in the percentage of active cells and in the DF / F fluorescence signal following movements occurring both during REM sleep and wakefulness (**Figure 2 - figure supplement 1C**). However, when combining all mouse pups, and considering separately twitches (occurring during REM/active sleep) and complex movements (occurring during wakefulness), based on video recordings, we found that the two movement types did not significantly differ in their impact on CA1 activity (**Figure 2 - figure supplement 1B**). Given this lack of difference, all movement types were thus combined in the following analysis steps. Post-movement activity was next computed, as defined by the number of active cells in the two seconds following movement onset divided by the number of active cells within a four seconds-long time window centered on movement onset (see methods, **Figure 2B** and **Figure 2 - figure supplement 1D**). The median post-movement activity progressively decreased from P5 to P9 (mean difference between consecutive age groups of 3.1 +/- 0.7 %) until it suddenly dropped at P10 (-13.5% between P9 and P10) and stabilized until P12. P9 marked the transition in the relationship between movement and CA1 activity. Indeed, the median post-movement activity exceeded 50 % from P5 to P8 (P5: 71 %, P6: 65 %, P7: 60 %, P8: 56 %). This

is consistent with the evolution of PMTHs (**Figure 2A**). After P9, the median post-movement activity was lower than 50 % (P10: 39 %, P11: 35 %, P12: 40 %), thus revealing the inhibitory action of movement on activity. We next defined as ‘inhibiting movements’ all the movements with a post-movement activity lower than 40 % and computed their proportion in each mouse (**Figure 2C**). The proportion of ‘inhibiting’ movements was stable before P9 (P5: 11 %, P6: 16 %, P7: 10 %, P8: 15 %). Again, P9 marks a transition since we observed that approximately half of the movements were followed by an inhibition of CA1 activity in P10-12 mice (P10: 55 %, P11: 58 %, P12: 48 %). The proportion of ‘inhibiting’ movements varies with age as a sigmoid function with P9 being the transition time point ($V_{50}=9.015$, $r^2=0.75$). In line with the emergence of movement-induced inhibition, the fraction of neurons significantly associated with immobility also increased with age, also following a sigmoidal function (**Figure 2D**, **sigmoid fit** $V_{50}=9.022$, $r^2=0.55$). Altogether, these results indicate that the end of the first postnatal week marks a transition in the evolution of CA1 dynamics, with both a decorrelation and a “detachment” of neuronal activity from spontaneous motor activity. We next investigated the circuit mechanisms supporting these changes.

GABAergic neurons remain activated by spontaneous movement throughout the first two postnatal weeks

As a first step to identify the circuit mechanisms for this switch, we focused on local circuits and disentangled the respective contribution of local GABAergic neurons and principal cells to CA1 dynamics as well as their relation to movement. To this aim, we identified GABAergic neurons with the expression of a red reporter (tdTomato) in *GAD1^{Cref/+}* pups virally infected with AAV9-FLEX-CAG-tdTomato and AAV1.hSyn.GCaMP6s (**Figure 3A, B**, **Figure 3 - figure supplement 1A**). In addition, we used these imaging experiments (**Figure 3 - figure supplement 1B - top row**) to train a cell classifier inferring interneurons in the absence of any reporter (**Figure 3 - figure supplement 1B - bottom row**). This classifier was able to infer interneurons with 91 % precision (**Figure 3 - figure supplement 1C**) (Denis et al., 2020). “Labeled” and “inferred” GABAergic neurons were combined into a single group referred to as “interneurons” in the following (**Figure 3 - figure supplement 1D, E**). As illustrated in a representative raster plot from a P5 mouse, both pyramidal cells (black) and interneurons (red) were activated during movement (vertical grey lines, **Figure 3A**). This was confirmed when computing the PMTH for pups aged less than P9, with the activation of the two neuronal populations after movement exceeding chance level (P5-8: N=17, n=33, pyramidal cells: baseline value = 0.51 %, peak value = 2.1 %, interneurons: baseline value = 2.1 %, peak value 7.9 %, N: number of mice, n: number of imaging sessions, **Figure 3A and Figure 3-figure supplement 2A**). In line with the above results (**Figure 2A**), pups older than P9 showed a significant reduction (below chance level) in the proportion of active pyramidal cells following movement (**Figure 3B**, P10-12: N=7, n=9, baseline value = 1.3 %, trough value = 0.4 %). In contrast, interneurons remained significantly activated following movement even past P9 (P10-12: N=7, n=9, baseline value = 3.9

%, peak value = 10 %, **Figure 3B and Figure 3-figure supplement 2B**). We conclude that the link between movement and activity evolves differentially towards the start of the second postnatal week when comparing pyramidal neurons and GABAergic interneurons, the former being inhibited or detached from movements while the latter remaining activated. This suggests that pyramidal neurons could be directly inhibited by local interneurons after the first postnatal week, following a functional maturation of GABAergic outputs onto principal cells. Alternatively, this could result from differential changes in the synaptic inputs driving both cell types. In the following, we have addressed both, non-mutually exclusive, hypotheses.

We first compared the developmental time course of extra-hippocampal synaptic afferences onto CA1 GABAergic neurons and pyramidal cells using a rabies retrograde tracing method (Wickersham et al., 2007). We focused on changes that may occur around the end of the first postnatal week. To do so, two groups were compared, an *early* (AAV1-hSyn-FLEX-nGToG-WPRE3 -Helper virus- injected at P0, SAD-B19-RVdG-mCherry -pseudotyped defective rabies virus- at P5 and immunohistochemistry (IHC) at P9, **Figure 3 - figure supplement 3A-C**) and a *late* one (AAV1-hSyn-FLEX-nGToG-WPRE3 -Helper virus- injected at P0, SAD-B19-RVdG-mCherry -pseudotyped defective rabies virus- at P9, IHC at P13, **Figure 3 - figure supplement 3D-F**). Injections were performed in either *GAD1^{Cre/+}* or *Emx^{Cre/+}* pups in order to specifically target GABAergic or glutamatergic cells, respectively. Four *GAD1^{Cre/+}* pups (2 early and 2 late injections) and three *Emx^{Cre/+}* pups (1 early and 2 late) were analyzed with injection sites restricted to the hippocampus. Starter and retrogradely labeled cells were found all over the ipsilateral hippocampus. For both *GAD1^{Cre/+}* and *Emx^{Cre/+}* pups, we found no striking difference in the retrogradely labeled extra-hippocampal regions between the *early* and *late* groups. In agreement with previous studies (Supèr and Soriano, 1994), we found that GABAergic and glutamatergic neurons in the dorsal hippocampus received mainly external inputs from the entorhinal cortex, the medial septum and the contralateral CA3 area (retrogradely labeled cells in these regions were found in 4 out of 4 *GAD1^{Cre/+}* pups and 3 out of 3 *Emx^{Cre/+}* pups, **Figure 3 - figure supplement 3**). Thus, we could not reveal any major switch in the nature of the extra-hippocampal inputs impinging onto local CA1 neurons. Thus, we next explored the maturation of local somatic GABAergic innervation given its significant evolution throughout that period (Jiang et al., 2001; Marty et al., 2002; Morozov and Freund, 2003) as well as our observation of a dense tdTomato signal in the pyramidal layer from *GAD1^{Cre/+}* mouse pups at P12 (**Figure 3B**), not visible at P5 (**Figure 3A**).

Abrupt emergence of a functional somatic GABAergic innervation at the beginning of the second postnatal week

We first analyzed the anatomical development of somatic GABAergic innervation within the CA1 pyramidal layer from P3 to P11, focusing on the innervation from putative parvalbumin-expressing

Basket Cells (PVBCs), its main contributor. To this aim, we performed immunohistochemistry against Synaptotagmin2 (Syt2) which has been described as a reliable marker for parvalbumin positive inhibitory boutons in cortical areas (**Figure 4A**, (Sommeijer and Levelt, 2012)). Using a custom-made Fiji-plugin (RINGO, see methods), we quantified the surface of the pyramidal cell layer covered by Syt2 labeling at different stages and found that between P3 and P7, PV innervation remained stable (median values: P3: 0.34 %, P5: 0.57 %, P7: 0.49 %, 3 mice per group, **Figure 4B**). However, after P9, an increase in the density of positive labeling was observed (P9: 1.03 %, P11: 1.48 %, 3 mice per group, **Figure 4B**). These results are consistent with previous work (Jiang et al., 2001; Marty et al., 2002), as well as with our tdTomato labeling (**Figure 3A-B**) and GCaMP imaging (**Figure 4 - figure supplement 1, Video 7**). They also match the transition observed in CA1 dynamics (**Figure 3**). We next tested whether GABAergic axons in the pyramidal layer were active during periods of movement. We restricted the analysis of these experiments to P9-10, as axonal arborization innervating the CA1 pyramidal layer was not present before (i.e., there was no fluorescent signal before P9 in the stratum pyramidale, **Figure 4 - figure supplement 1, Video 7**). To do so, we restrained the expression of the calcium indicator GCaMP6s to the axon (Broussard et al., 2018) of interneurons using *GAD1^{Cre/+}* mouse pups and specifically imaged axonal arborisation in the pyramidal cell layer (**Figure 4C, left panel**). Fluorescence signals were extracted from axonal branches using PyAmnesia (a method to segment axons, see methods, **Figure 4C, right panel**), and then normalized using DF / F . As expected, (see **Figure 3B**), an increase in the fluorescent signal from GABAergic axonal branches was observed following movement (P9-10: n=3 mice, **Figure 4D**). As a result, we reasoned that emergence of functional perisomatic GABAergic activity could contribute to the reduction of activity observed after movement during the second postnatal week in pyramidal neurons.

Increasing feedback inhibition in two-population models explains the developmental transition

To test whether an increase in perisomatic inhibition alone can explain the switch in network dynamics between the first and second postnatal weeks, we simulated a two-population network model mimicking the development of perisomatic innervation (**Figure 5A, see Methods**). Using a rate model and a Leaky Integrate and Fire (LIF) model, we show that increasing the number of perisomatic inhibitory connections can account for the experimentally observed decrease of responses to movement-like feedforward inputs (**Figure 5B**). Time constants of the rate model and synaptic time constants of the LIF model were chosen to match the slow kinetics of synaptic transmission that exist at early developmental stages (see **Figure 5 Source data 1**). Faster excitatory and inhibitory time scales, on the order of a few milliseconds, generate network dynamics that could not be followed by our calcium sensor. We chose to model them by simply providing a noisy, normally distributed, input

to all the cells. Durations of feed-forward inputs were chosen similar to experimental movement durations (see **Figure 5 - figure supplement 1A** for a log-normal fit of the movement durations). When inhibition is weak, the average activity of the pyramidal neurons increases at the onset of a given twitch. Then, it quickly relaxes to the baseline with a timescale that follows the synaptic time constant (**Figure 5B, left panel**). In the presence of strong inhibition, there is a reduction in response to movement inputs. In addition, due to strong feedback inhibition following the movement responses, network activity relaxes to the baseline with an undershoot (**Figure 5B, right panel**), recapitulating the experimental findings (see **Figure 2A**). Similarly, PMTHs for interneurons were obtained (see **Figure 5 - figure supplement 1B**).

The inhibition of principal cells following movements after P9, revealed by the PMTHs, could result from the development of a direct external inhibitory input or from changes in local circuits. In order to further examine the nature of the interaction between local pyramidal cells and interneurons displayed a direct interaction in the absence of the external movement-related input, we next used our experimental data to compute the cross-correlograms between interneurons and pyramidal cells calcium transients (inferred by DeepCINAC (Denis et al., 2020)) in the periods without movement (P5-8 light gray curve, P9-12 dark curve, **Figure 5C, left panel**). For P9-12, we observed a rapid drop in the correlation at positive time points suggesting a feed-forward inhibition of principal cells activity. Such drop was absent for P5-8, where the cross-correlogram was symmetric and centered at zero. Both the rate and LIF models displayed similar activity correlograms as the experimental data, with an undershoot in the presence of strong inhibitory feedback for positive time points (**Figure 5C, middle and right panels**). Thus, increasing JEI has the effect of strengthening the cross-correlation undershoot. JEI for both models were chosen to match the amplitude of this undershoot while at the same time matching the inhibition observed in the PMTHs. Auto-correlograms of the excitatory and inhibitory activity were also measured and compared to our model predictions (**Figure 5 - figure supplement 1C**).

The consistency of our models with the experimental cross-correlograms, which were computed from the activity recorded during periods of immobility, further shows that the observed network dynamics and, in particular, the correlation undershoots most likely result from recurrent perisomatic inhibition rather than a feedforward drive from upstream areas. Therefore, in our model, the maturation of perisomatic inhibition alone was sufficient to support a switch in network dynamics.

DISCUSSION

Using for the first time *in vivo* two-photon calcium imaging in the hippocampus of non-anesthetized mouse pups and a deep-learning based approach to infer the activity of principal cells and

interneurons, we show that the end of the first postnatal week marks a salient step in the anatomical and functional development of the CA1 region. Indeed, within two days (P8-10), the link between CA1 principal cells activity and self-triggered movements is inverted and neurons are preferentially active during immobility periods. This is likely due to the time-locked anatomical and functional rise of somatic GABAergic activity given that interneurons remain highly active throughout this period, including in response to spontaneous movements. In this way, CA1 circuits start detaching from external inputs. Given the importance of local dynamics for hippocampal function and cortical circuits operation in general, this is likely to be a critical general step in the proper maturation of cognitive circuits.

Early postnatal calcium activity in CA1 is driven by sensorimotor inputs

We found that, until P7-9, spontaneous movements are followed by a significant peak in calcium events in the CA1 principal cell layer and that most neuronal activity occurs during synchronous calcium events. This early link between sensorimotor inputs and early cortical dynamics has been previously reported using electrophysiological recordings in various areas and species, including humans (Milh et al., 2006). Here we extend that observation to calcium transients, which not only indirectly report action-potential firing as well as other modes of cell activation during development but also critically regulate activity-dependent genetic processes. In addition, we could describe the response to these movements with single-cell resolution. Of note, it is important to keep in mind that part of the overlying cortex, including the primary sensory cortex, was removed to grant optical access to the hippocampus. This region may contribute in relaying the sensory feedback from the twitches to the hippocampus (Khazipov and Milh, 2018; Valeeva et al., 2019a). The surgical procedure may thus damage incoming axons from the temporoammonic track linking the entorhinal cortex to the hippocampus. Accordingly, we observed: i) that the CA1 response to movements from the contralateral limbs was slightly reduced; ii) that the eSW frequency in the ipsilateral hemisphere was slightly diminished; iii) a small increase in the power spectra of network oscillations below 20Hz. In addition, it cannot be excluded that other movements that we have not detected, like whisker movements, could also contribute to the patterning of CA1 activity. It is also possible that self-generated activity from other sensory organs but independent from movement, like the retina or the olfactory bulb, also contribute to hippocampal dynamics. Interestingly, in contrast to previous reports (Tiriac and Blumberg, 2016), we could not observe any significant difference between twitches (occurring mainly during active sleep) and longer, more complex movements (associated with wakefulness). In one mouse pup, we directly combined 2-photon imaging with EMG recordings to better define brain states and confirmed that, both REM and wake-associated movements were followed by an activation of CA1 neurons, with the latter triggering a smaller response. This difference with previous reports (Tiriac and Blumberg, 2016), may reveal a difference between calcium imaging and electrophysiology, the former sampling from a larger population but at a lower

temporal and spike signal resolution. The patterning of CA1 dynamics in the large imaged population did not reveal any obvious spatial distribution for movement-activated cells but we cannot exclude that these would vary along the radial and transverse directions, which are the two main axes of principal cell development (Caviness, 1973), and are differentially targeted by perisomatic PV basket cells (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015).

Passed the end of the first postnatal week, between P8 and P10, a significant decrease in the fraction of coactive principal cells following movement was observed (while interneurons remained mostly activated by movement). We cannot exclude that some spikes fell below the threshold for detection of calcium events. In this case, rather than full inhibition, it may be that a strong shortening of the time window for neuronal integration occurred (due to feedback inhibition), which would limit the number of spikes produced by principal cells and thus keep them below detection levels. Yet, a novel machine-learning based algorithm (Denis et al., 2020) was used since it was especially designed to infer activity in the dense CA1 pyramidal cell layer. This change in the polarity of principal cells' response to movements is quite abrupt as it happens within less than two days (between P8 and 10). This contrasts with the progressive evolution of single cell firing frequencies but matches the fast redistribution of neuronal firing towards immobility periods. In this way, hippocampal neuronal dynamics “internalize” as they stop being driven by movements and preferentially occur within rest. Of note, a small increase in the fraction of active cells can be observed approximately one second before the onset of movement in P12 pups, indicating that activity would start building up in CA1 prior to movement. A corollary discharge would increase activity prior to movement on a much shorter time scale. There is therefore no obvious explanation for this interesting phenomenon. Anticipatory cell firing prior to locomotion has been previously reported in the adult cortex (see for example (Vinck et al., 2015)). Different mechanisms could support such anticipatory firing, including the influence of top-down inputs, changes in arousal states or any complex neuromodulatory interactions possibly associated with changes in the sleep-wake cycle and that could involve, for example, the norepinephrine, serotonin or acetylcholine systems.

This “internalization” of hippocampal dynamics is reminiscent of similar phenomena observed in other cortical areas, such as the barrel cortex where whisker stimulation induces a reduction in the size of cell assemblies following P9 while the same stimulation widens cell assembly size a few days before (Mòdol et al., 2019). It is also reminiscent of the recently described transient quiescent period observed in the somatosensory cortex using extracellular electrophysiological recordings (Dominguez et al., 2021). Last, it goes in hand with a sparsification of activity, which is a general developmental process supported by the emergence of inhibition (Golshani et al., 2009; Rochefort et al., 2009; Wolfe et al., 2010).

Circuit basis for the movement-triggered inhibition of CA1 dynamics

Our results demonstrate that the change in CA1 dynamics occurring at the end of the first postnatal week most likely relies on structural changes in local CA1 circuits rather than rewiring of the long-range extrahippocampal connectivity.

The long-range circuits mediating the bottom-up flow of self-triggered or externally generated sensory information to the hippocampus are starting to be elucidated. The two main structures directly transmitting sensorimotor information to the dorsal CA1 are the entorhinal cortex and septum. The former processes multisensory information from all sensory cortices (visual, auditory, olfactory, somatosensory), including movement-related sensory feedback (Rio-Bermudez and Blumberg, 2021) and was shown to be activated by spontaneous twitches prior to CA1 (Mohns and Blumberg, 2010; Rio-Bermudez et al., 2020; Valeeva et al., 2019a) while the latter is more likely to be involved in transmitting internal information (Fuhrmann et al., 2015; Wang et al., 2015) as well as unexpected environmental stimuli (Zhang et al., 2018). In addition to these two canonical pathways, one cannot exclude the involvement of a direct connection from the brainstem, given their existence in the adult and their role in promoting sleep as well as motor twitches (Liu et al., 2017; Szőnyi et al., 2019). However, our retrograde tracing experiments did not reveal any direct connection between the CA1 cells and the brainstem at the early ages analyzed here. In addition, we found that both CA1 interneurons and principal cells receive inputs from the septum and entorhinal cortex before the time of the switch (i.e. P9) and that there was no major qualitative change of inputs after, as expected from previous work (Supèr and Soriano, 1994). Still, these experiments do not allow a quantitative assessment of the number of inputs nor the type of inputs (GABAergic, cholinergic, etc.) and we cannot fully exclude that a stronger, or different source of excitatory drive would be impinging onto interneurons after the switch. Neither can we exclude a functional maturation of those extrinsic inputs. Therefore, future optogenetic and slice physiology work is needed to characterize the bottom-up information flow onto specific components of the local CA1 circuits. Similarly, one cannot exclude a change in the CA3 to CA1 connectivity. Indeed, Schaffer collaterals are known to reach CA1 roughly around the end of the first postnatal week (Durand et al., 1996). In addition, roughly at the time of the switch, we do see the emergence of SWRs (Buhl and Buzsaki, 2005), a pattern strongly relying on CA3 inputs and perisomatic GABAergic transmission. However, we could not restrict the pool of starter cells to the CA1 region in our retrograde viral tracing experiments, which precluded analysis of the development of CA3-CA1 connectivity. Interestingly, among the external inputs onto CA1 described above, the entorhinal cortex and CA3 were both shown to exert a mild influence on the organization of intrinsic CA1 dynamics, possibly pointing at a critical role of local interneurons in this process (Zutshi et al., 2021).

As indicated by our computational model, the disengagement from movement of CA1 dynamics can be fully explained by the observed rise in anatomical (Syt2 labeling) and functional

(axonal GCaMP imaging) connectivity from perisomatic GABAergic cells onto pyramidal cells at the onset of the second postnatal week. This increased connectivity could not be easily captured with our retrograde viral labeling since the absence of early PV expression precludes the identification of PV basket cells, the most prominent subtype of perisomatic GABAergic cells, among retrogradely labelled cells in *Emx^{Cre/+}* pups. Early anatomical studies had already indicated that an increase of somatic GABAergic inhibition, including from CCK-basket cells, occurred in CA1 during the first postnatal week (Danglot et al., 2006; Jiang et al., 2001; Marty et al., 2002; Morozov and Freund, 2003). However, this rise was expected to be more progressive and not as abrupt as observed here, as it happened within two days. If the axonal coverage of the *stratum pyramidale* by PV-basket cells axons increases, we cannot exclude that this is a general phenomenon, concerning all perisomatic subtypes, including soma-targeting CCK-expressing basket cells which develop anatomically at around the same time (Morozov and Freund, 2003) or chandelier cells. In addition, our computational model indicates that the emergence of feed-back inhibition is sufficient to reproduce the developmental shift observed here, which could also involve other types of CA1 interneurons, including dendrite-targeting ones.

Interestingly, a similar rise of somatic GABAergic axonal coverage occurs in the barrel cortex at the same time. Indeed, recent connectomic mapping using 3D-electron microscopy in that region revealed that the preferential targeting of cell bodies by GABAergic synapses increased almost threefold between postnatal days 7 and 9 (Gour et al., 2020), whereas two-photon imaging of putative GABAergic somatic axons in the same region revealed broader domains of co-activation (Mödol et al., 2019). This time period for the shift may be synchronous within brain regions involved in sensorimotor integration such as the hippocampus and somatosensory cortex. Otherwise, PV expression was shown to develop sequentially in a region-specific manner (Reh et al., 2020) following their intrinsic developmental age (Donato et al., 2017).

We found that many principal cells are inhibited by movement while most imaged GABAergic cells remained activated during the second postnatal week. This therefore indirectly suggests a net inhibitory effect of GABAergic transmission after the first postnatal week. This is expected since the shift from excitatory to inhibitory synaptic transmission was reported to occur earlier in the hippocampus *in vivo* (Murata and Colonnese, 2020). On a side note, the lack of somatic GABAergic inputs before P7 indicates that the early excitatory GABAergic drive in CA1 circuits likely originates from non-somatic GABAergic interneurons, which include long-range, dendrite-targeting or interneuron-specific interneurons. The circuit role of excitatory GABAergic transmission should be revisited taking into account this new finding.

The movement-associated inhibition could result equally from feedforward (direct activation of interneurons from movement-transmitting inputs such as the entorhinal cortex) or feedback (from

local CA1 cells) inhibition. Our analysis of pairwise correlations in the absence of movement as well as our computational simulations indicate the latter. A similar strengthening of feedback inhibition has previously been observed in the developing somatosensory cortex (Anastasiades and Butt, 2012). The inhibition of activity following movement is likely to be occurring during a transient developmental period. Indeed, in the adult, both interneurons and principal cells usually increase their activity as the animal moves (Fuhrmann et al., 2015). Therefore the switch observed here opens another developmental time-window that probably closes with the emergence of perineuronal nets and cell activation sequences at the end of the third developmental week (Farooq and Dragoi, 2019; Horii-Hayashi et al., 2015; Muessig et al., 2019). We would like to propose this developmental window, to be the critical period for CA1 development, a period during which experience-dependent plasticity can be observed.

Conclusion

Cognitive hippocampal maps rely on two forms of representation, one that is map-based or allocentric and the other that is self-referenced, or egocentric and requires body movement. We would like to propose that the early postnatal period described here, where the hippocampus learns the statistics of the body, and which terminates with the rise of a recurrent inhibitory network is a key step for the emergence of self-referenced representations onto which exploration of the external world can be grafted. An imbalance between self-referenced and environmental hippocampal representations due to a miswiring of local somatic inhibition could have major outcomes. It could be at the basis of several neurodevelopmental disorders, including autism spectrum disorders (ASD) and schizophrenia. Interestingly, both disorders have been associated with an aberrant maturation of PV-expressing interneurons (Gogolla et al., 2014; Jurgensen and Castillo, 2015; Lewis et al., 2005). In addition, the proper development of the peripheral sensory system, which is partly initiating the early CA1 dynamics reported in our study, is also critically involved in ASD (Orefice et al., 2016). The period described here corresponds to the third trimester of gestation and likely extends postnatally given the protracted integration of GABAergic interneurons into functional circuits in the human brain (Murphy et al., 2005; Paredes et al., 2016). Future work should determine when a similar rise in somatic inhibition occurs in human infants and test whether it could constitute a valuable biomarker for cognitive neurodevelopmental disorders.

MATERIALS AND METHODS

MICE

All experiments were performed under the guidelines of the French National Ethics Committee for Sciences and Health report on "Ethical Principles for Animal Experimentation" in agreement with the European Community Directive 86/609/EEC (Apafis#18-185 and #30-959).

485 **EXPERIMENTAL PROCEDURES AND DATA ACQUISITION**

486 **Viruses.** *In vivo* calcium imaging experiments were performed using AAV1-hSyn-
487 GCaMP6s.WPRE.SV40 (pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 was a gift from Douglas Kim & GENIE
488 Project (Addgene viral prep #100843-AAV1; <http://n2t.net/addgene:100843>;
489 RRID:Addgene_100843)), AAV9-FLEX-CAG-tdTomato (pAAV-FLEX-tdTomato was a gift from
490 Edward Boyden (Addgene viral prep # 28306-AAV9 ; <http://n2t.net/addgene:28306> ;
491 RRID:Addgene_28306)), AAV9-hSyn-FLEX-axon-GCaMP6s (pAAV-hSynapsin1-FLEEx-axon-
492 GCaMP6s was a gift from Lin Tian (Addgene viral prep # 112010-AAV9 ;
493 <http://n2t.net/addgene:112010> ; RRID:Addgene_112010)). Retrograde tracing experiments were
494 performed using AAV1-hSyn-FLEX-nGToG-WPRE3 (Charité #BA-096) and SAD-B19-RVdG-
495 mCherry (Gift from the Conzelmann laboratory).

496 **Intracerebroventricular injection.** This injection protocol was adapted from already published
497 methods (Kim et al., 2014). Mouse pups were anesthetized on ice for 3 – 4 min, and 2 µL of viral
498 solution (titration at least 1×10^{13} vg / mL) were injected in the left lateral ventricle whose coordinates
499 were estimated at the 2/5 of the imaginary line between the lambda and the eye at a depth of 0.4 mm.
500 Correct injection was visualized by the spreading of the viral-dye mixture (1/20 of fast blue). In
501 SWISS mouse pups we injected 2 µL of AAV2.1-hSyn-GCaMP6s.WPRE.SV40, in *GAD1^{Cre/+}* mouse
502 pups we injected either a mix of 1.3µL of AAV2.1-hSyn-GCaMP6s.WPRE.SV40 with 0.7µL of
503 AAV9-FLEX-CAG-tdTomato or 2µL of AAV9-hSyn-FLEX-axon-GCaMP6s.

504 **Intra-hippocampal injection.** When hippocampal viral injections were performed at P0 (AAV1-hSyn-
505 FLEX-nGToG-WPRE3), mouse pups were anesthetized by inducing hypothermia on ice and
506 maintained on a dry ice-cooled stereotaxic adaptor (Stoelting, # 51615) with a digital display console
507 (Kopf, Model 940). Dorsal hippocampus was targeted by empirically determined coordinates, based
508 on the Atlas of the Developing Mouse Brain (Paxinos et al., 2020), using transverse sinus and superior
509 sagittal sinus as reference: 0.8 mm anterior from the sinus intersection; 1.5 mm lateral from the
510 sagittal sinus; 1.1 mm depth from the skull surface. Under aseptic conditions, an incision was made in
511 the skin, the skull was exposed and gently drilled (Ball Mill, Carbide, #¼ .019” -0.500 mm diameter-,
512 CircuitMedic). Ten nL of undiluted viral solution were injected using an oil-based pressure injection
513 system (Nanject III, Drummond Scientific, rate of 5 nL/min). The tip of the pipette was broken to
514 achieve an opening with an internal diameter of 30-40 µm. When hippocampal viral injections were
515 performed at P5 or P9 (SAD-B19-RVdG-mCherry), pups were anesthetized using 3 % isoflurane in a
516 mix of 90 % O₂-10 % air and maintained during the whole surgery (~0:30 h) between 1 % and 2.5 %
517 isoflurane. Body temperature was monitored and maintained at 36°C. Analgesia was controlled using
518 Buprenorphine (0.05 mg/ kg). Under aseptic conditions, an incision was made in the skin, the skull
519 was exposed, antero-posterior and medio-lateral coordinates of the dorsal hippocampus were

estimated by eye looking at the skull sutures. The skull was gently drilled and 10 nL of a viral solution were injected (Nanoject III, Drummond Scientific, rate of 5 nL/min) at a depth of 1.25 mm below the dura.

Window implant surgery. The surgery to implant a 3-mm-large cranial window above corpus callosum was adapted from previous methods (Villette et al., 2015). Anesthesia was induced using 3 % isoflurane in a mix of 90 % O₂-10 % air and maintained during the whole surgery (~1:30 h) between 1 % and 2.5 % isoflurane. Body temperature was controlled and maintained at 36°C. Analgesia was controlled using Buprenorphine (0.05 mg/ kg). Coordinates of the window implant were visually estimated. Then a small custom-made headplate was affixed with cyanoacrylate and dental acrylic cement. The skull was removed and the cortex was gently aspirated until the appearance of the external capsule/alveus. At the end of the cortectomy, we sealed a 3 mm glass window diameter circular cover glass (#1 thickness, Warner Instrument) attached to a 3 mm diameter large and 1.2 mm height cannula (Microgroup INC) with Kwik-Sil adhesive (WPI) and fixed the edge of the glass with cyanoacrylate. We let the animal recover on a heated pad for at least one hour before the imaging experiment.

Imaging. Two-photon calcium imaging experiments were performed on the day of the window implant using a single beam multiphoton pulsed laser scanning system coupled to a microscope (TriM Scope II, LaVision Biotech). The Ti: sapphire excitation laser (Chameleon Ultra II, Coherent) was operated at 920 nm. GCaMP fluorescence was isolated using a bandpass filter (510/25). Images were acquired through a GaAsP PMT (H7422-40, Hamamatsu) using a 16X immersion objective (NIKON, NA 0.8). Using Inspector software (LaVision Biotech), the fluorescence activity from a 400 µm x 400 µm field of view was acquired at approximately 9 Hz with a 1.85 µs dwell time per pixel (2 µm/pixel). Imaging fields were selected to sample the dorsal CA1 area and maximize the number of imaged neurons in the *stratum pyramidale*. Piezo signal, camera exposure time, and image triggers were synchronously acquired and digitized using a 1440A Digidata (Axon instrument, 50 kHz sampling) and the Axoscope 10 software (Axon instrument). During the imaging session, body temperature is continuously controlled.

Behavioral recordings. Simultaneously with imaging experiments, mouse motor behavior was monitored. In a first group of animals, motor behavior was monitored using two or three piezos attached to the paws of the animal. The signal from the piezo was acquired and digitized using a 1440A Digidata and the Axoscope 10 software. In a second group of animals, pups were placed and secured on an elevated platform (with the limbs hanging down on each side without touching the ground nor the support, as described here (Blumberg et al., 2015)). Motor behavior was monitored using two infrared cameras (Basler, acA1920-155um) positioned on each side of the animal. For each camera, a square signal corresponding to the exposure time of each frame from the camera was

acquired and digitized using a 1440A Digidata and the Axoscope 10 software. If the number of behavior frames from the square signal was higher than the number of saved frames (meaning that some camera frames were dropped during the acquisition) the imaging session was excluded from any movement related analysis (see Table 1).

Recording of electromyogram activity in neonatal mice. The vigilance state of neonatal mice was assessed through analysis of electromyogram (EMG) signals obtained from a single insulated Tungsten wire (A-M Systems 795500) implanted in the nuchal muscle. A stainless-steel wire (A-M Systems 786000) wire inserted on the skull surface above the cerebellum and secured in place with dental cement served as the reference electrode. Signals from the electrodes were first passed through a headstage pre-amplifier before being digitized at 16000 Hz (Digital Lynx SX, Neuralynx (the pre-amplifier and digitizer were both from Neuralynx, as was the acquisition software (Cheetah))) and saved to a hard disk. TTL signals from the imaging and camera acquisition systems were simultaneously recorded as well to enable precise synchronization of EMG recordings with the camera and imaging data.

In vivo extracellular electrophysiological recordings. Multisite probes (16 channels silicon probes with 50 μ m separation distance, NeuroNexus, USA) were used to record electrophysiological activity below the window implant and in the intact hippocampus. To do so, we positioned the mouse pup (that had previously undergone a window implant) on the experimental setup. To head fix the animal the skull surface was covered with a layer of dental acrylic except the area above the intact hippocampus. In the intact (contralateral) hippocampus the electrodes were positioned using the stereotaxic coordinates of approximately 1.5 mm anterior to lambda and 1.5 mm lateral from the midline. Hippocampus under the window was recorded through the hole drilled in the window implant. Both multisite silicon probes were positioned at the depth to record *strata oriens* (SO), *pyramidale* (SP), *radiatum* (SR) and *lacunosum moleculare* (SLM). After the positioning of the electrodes, the animal was left in the setup for one hour to recover followed by 2 hours recordings of the neuronal activity in both hippocampi simultaneously.

Histological processing. Pups were deeply anaesthetized with a mix of Domitor and Zoletil (0.9 and 60 mg/kg, respectively), then transcardially perfused with 4 % PFA in 0.1M PBS (PBS tablets, 18912-014, Life technologies). For perisomatic innervation analysis, brains were post-fixed overnight at 4°C in 4 % PFA in 0.1M PBS, washed in PBS, cryo-protected in 30 % sucrose in PBS, before liquid nitrogen freezing. Brains were then sectioned using a cryostat (CM 3050S, Leica) into 50 μ m thick slices collected on slides. Sections were stored at -20°C until further usage. For tracing experiments, brains from *GAD1^{Cre/+}* and *Emx^{Cre/+}* pups (The Jackson Laboratory JAX:005628), were post-fixed overnight at 4 °C in 4 % PFA in 0.1M PBS, washed in PBS and sectioned using a vibratome (VT 1200 s, Leica) into sagittal 70–80 μ m thick slices. Sections were stored in 0.1M PBS containing 0.05

% sodium azide until further usage. Immunocytochemistry was processed as described previously (Bocchio et al., 2020) . Briefly, sections were blocked with PBS-Triton (PBST) 0.3 % and 10 % normal donkey serum (NDS), and incubated with a mix of up to three primary antibodies simultaneously diluted in PBST with 1 % NDS overnight at room temperature with the following primary antibodies: rabbit anti-dsRed (1:1000; Clontech, AB_10013483), chicken anti-GFP (1:1000, Aves Labs, GFP-1020, AB_10000240), mouse anti-synaptotagmin-2 (1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank, AB_2315626). After several washes, according to the mixture of primary antibodies, the following secondary antibodies were used: donkey anti-chicken Alexa 488 (1:500, SA1-72000), donkey anti-rabbit Alexa 555 (1:500, ThermoFisher, A31570), donkey anti-mouse Alexa 488 (1:500, ThermoFisher, A21202), donkey anti-mouse Alexa 647 (1:500, ThermoFisher, A31571). After Hoechst counterstaining, slices were mounted in Fluoromount. Epifluorescence images were obtained with a Zeiss AxioImager Z2 microscope coupled to a camera (Zeiss AxioCam MR3) with an HBO lamp associated with 470/40, 525/50, 545/25, and 605/70 filter cubes. Confocal images were acquired with a Zeiss LSM-800 system equipped with a tunable laser providing excitation range from 405 to 670 nm. For quantifying synaptotagmin-2, 11µm thick stacks were taken (z=1µm, pixel size=0,156µm) with the confocal microscope using a plan-Achromat 40x/1,4 Oil DIC objective.

DATA PREPROCESSING

Motion correction. Image series were motion corrected either by finding the center of mass of the correlations across frames relative to a set of reference frames (Miri et al., 2011) or using the NoRMCorre algorithm available in the CaImAn toolbox (Pnevmatikakis and Giovannucci, 2017) or both.

Cell segmentation. Cell segmentation was achieved using Suite2p (Pachitariu et al., 2017). Neurons with pixel masks including processes (often the case for interneurons located in the stratum oriens) were replaced by soma ROI manually drawn in ImageJ and matched onto Suite2p contours map using CICADA (Calcium Imaging Complete Automated Data Analysis, source code available on Cossart lab GitLab group ID: 5948056). In experiments performed on *GAD1^{Cre/+}* animals, tdTomato labelled interneurons were manually selected in ImageJ and either matched onto Suite2p contours map or added to the mask list using CICADA.

Axon segmentation. Axon segmentation was performed using pyAMNESIA (a Python pipeline for analysing the Activity and Morphology of NEurons using Skeletonization and other Image Analysis techniques, source code available on Cossart lab GitLab group ID: 5948056). pyAMNESIA proposes a novel image processing method based on 3 consecutive steps: 1) extracting the axonal morphology of the image (skeletonization), 2) discarding the detected morphological entities that are not

functional ones (branch validation), and 3) grouping together branches with highly correlated activity (branch clustering). To extract the skeleton, we first perform 3D gaussian smoothing and averaging of the recording, producing an image that summarizes it; on this image are then successively applied a histogram equalization, a gaussian smoothing, an adaptive thresholding, and finally a Lee skeletonization (Suen et al., 1994), allowing for the extraction of the skeleton mask and the morphological branches. To ensure the functional unity of the segmented branches, we only kept those that illuminated uniformly, where uniformity was quantified by the skewness of the pixel distribution of the branch during a calcium transient (branch validation). To cluster the valid branches based on their activity, we first extracted their average trace -- being the average image intensity along the branch for each frame -- and then clustered the branches traces using t-SNE and HDBSCAN algorithms with Spearman correlation metric (branch clustering).

Cell type prediction. Cell type prediction was done using the DeepCINAC cell type classifier (Denis et al., 2020). We used imaging sessions from *GAD1^{Cre/+}* mouse line injected with a viral mixture of AAV2.1-hSyn-GCAMP6s.WPRE.SV40 and AAV9-FLEX-CAG-tdTomato allowing us to manually identify in our recordings genetically labelled interneurons to train and test a cell type classifier. Overall we used 643 cells (245 labelled interneurons, 245 putative pyramidal cells and 153 noisy cells) to train the cell type classifier and 100 cells (38 labelled interneurons, 51 putative pyramidal cells and 11 noisy cells) to evaluate its performance. Briefly, a neuronal network composed of a convolutional neural network (CNN) and Long Short-Term Memory (LSTM) was trained using labeled interneurons, pyramidal cells and noisy cells to predict the cell type using 100 frames long movie patches centered on the cell of interest. Each cell was classified as interneuron, pyramidal cell or noise. Cells classified as ‘noisy cells’ were removed from further analysis. ‘Labelled interneurons’ were first kept in a separate cell type category and added to the interneurons list that were inferred with a 91 % precision.

Activity inference. Activity inference was done using DeepCINAC classifiers (Denis et al., 2020). Briefly, a classifier composed of CNN and LSTM was trained using manually-labelled movie patches to predict neuronal activation based on movie visual inspection. Depending on the inferred cell type, activity inference was done using either a general classifier or an interneuron-specific classifier. Activity inference resulted in a (cells x frames) matrix giving the probability for a cell to be active at any single frame. We used a 0.5 threshold in this probability matrix to obtain a binary activity matrix considering a neuron as active from the onset to the peak of a calcium transient.

Behavior. Piezo signals were manually analyzed in a custom-made graphical user interface (Python Tkinter) to label the onset and offset of ‘twitches’, ‘complex movements’ and ‘unclassified movements’. Twitches were defined as brief movements (a few hundred milliseconds-long) occurring within periods of rest and detected as rapid deflections of the piezo signal. ‘Complex movements’

were defined as periods of movement lasting at least 2 seconds. A few others detected movements could not be categorized based on their duration and occurrence as twitches or complex movements. These ones are referred to as ‘unclassified movements. These unclassified movements were excluded from the analysis when it is specified that complex movements or twitches only were used but included in analysis when all kinds of movements were combined. Analysis of video tracking was done using CICADA and behavior was manually annotated in the BADASS (Behavioral Analysis Data And Some Surprises) GUI. If camera frames were dropped during the acquisition the imaging session was excluded from any movement related analysis.

Neurodata without border (NWB: N) embedding. For each imaging session, imaging data, behavioral data, cell contours, cell type prediction, calcium traces and neuronal activity inference were combined into a single NWB: N file (Rubel 2022). Our NWB: N data set is accessible on DANDI archive (<https://gui.dandiarchive.org/#/>) - ref DANDI:000219. NWB offers a common format for sharing, among others, calcium imaging data and analyzing them. Subsequently we developed an open-source python toolbox to analyze imaging data in the NWB format.

MODELING

Network implementation. We constructed a simple rate model and subsequently a more realistic spiking network in order to test our hypothesis that an increase in perisomatic inhibition could explain the switch in network dynamics between the first and second postnatal week. Both models consisted of one excitatory and one inhibitory population with recurrent interactions (**Figure 5A, Appendix 1**). The development of perisomatic innervation was simulated by increasing the strength from inhibitory to excitatory cells (J_{EI}). The external input to the model was composed of a constant and a white noise term. To estimate the responses to twitch-like inputs, an additional feedforward input composed of short pulses was fed to the network. In the rate model, the rates represented the population averaged activities. The spiking network was constructed with Leaky Integrate and Fire (LIF) neurons. The network connectivity was sparse and each neuron received inputs from randomly selected neurons. Presynaptic spikes resulted in exponentially decaying postsynaptic currents (**see Figure 5 Source data 1** for the model parameter values). All codes used for the modelling are available at <https://gitlab.com/rouault-team-public/somatic-inhibition/>, project ID: 33964849.

DATA ANALYSIS

Sample-size estimation. This study being mainly exploratory in the sense that the evolution of population activity in the CA1 region of the hippocampus during early development using large scale imaging has not been described before, we have not been able to use explicit power calculation based on an expected size effect.

Histological quantifications. Confocal images of synaptotagmin-2 immunostaining were analyzed using RINGO (RINGs Observation), a custom made macro in Fiji. We first performed a max-intensity projection of the Z-stack images of the top 6 μm from the slice surface, then images were cropped to restrict the analysis to the pyramidal cells layer. Obtained images were denoised using Fiji “remove background” option and then by subtracting the mean intensity of the pixels within a manually drawn ROI in the background area (typically the cell body of a pyramidal neuron). Denoised images were then binarized using a max-entropy thresholding (Fiji option). Finally, particles with size between 0.4 μm^2 and 4 μm^2 were automatically detected using the Fiji “Analyse particle” option. We then computed the proportion of the pyramidal cell layer (i.e., surface of the cropped region) covered by positive synaptotagmin-2 labelling.

In vivo electrophysiology. The neuronal activity recorded from both hippocampi in vivo using a 64-channel amplifier (DIPSI, France) was analyzed post-hoc. Firstly, data was down sampled to 1 kHz to save disc space. The local field potential (LFP) was band-passed (2-100 Hz) using the wavelet filter (Morlet, mother wavelet of order 6) and the common reference was subtracted to exclude the bias produced by volume conducted fluctuations of LFP. Sharp Wave events (SWs) were detected using a threshold approach. Firstly, LFP was band passed (2-45 Hz) and the difference between lfp recorded in the *strati oriens*, *pyramidale* and *radiatum* was calculated. Events were considered as SWs if: i) LFP reversion was observed in the *stratum pyramidale*, ii) their peak amplitude in the resulting trace exceeded the threshold of 4 standard deviations calculated over the entire trace (the threshold corresponds to p values below 0.01). The occurrence rate of SW was calculated over the entire recording and normalized to 1 min. SW co-occurrence was also calculated by cross correlating the SW timestamps from ipsilateral and contralateral hippocampi using a bin size of 10 milliseconds. Spectral analysis was carried out using the Chronux toolbox (Chronux, toolbox, 2010). Spectral power was estimated using direct multi-taper estimators (3 time-bandwidth product and 5 tapers).

Statistics for in vivo electrophysiology. Group comparisons were done using non parametric Wilcoxon rank sum test for equal medians, p-value of 0.05 was considered significant. Variability of the estimates was visualized as shaded bands of standard deviation computed using jackknife.

Vigilance state determination in neonatal mice. All analysis of EMG data was completed using custom scripts in MATLAB (Cossart lab Gitlab, group ID 5948056 Project ID: 36204799). For each experiment, the raw EMG data was first down sampled to 1000 Hz and subsequently high-pass filtered at 300 Hz and rectified. The processed data was then plotted to allow for manual inspection. Consistent with prior reports (Mohns and Blumberg, 2010), the data was primarily composed of alternating periods of high EMG tone (referred to as wakefulness) associated with ‘complex’ movements as well as periods of low EMG tone associated with a general behavioral quiescence and the presence of periodic brief myoclonic twitches (referred to as ‘active sleep’ due to the frequent

observation of muscle twitches (Mohns and Blumberg, 2010). For vigilance state determination, we therefore utilized a protocol similar to that described previously (Rio-Bermudez et al., 2015). For both the ‘high’ and ‘low’ EMG tone conditions, 5 periods, each 1 s in duration, were first sampled from locations spread out over the entire recording length. Data from the samples were then pooled for each condition and the average value of the rectified signal was determined. Next, the midpoint between the average rectified signal values calculated for the ‘high’ and ‘low’ EMG tone conditions was determined for subsequent use as a threshold to separate periods of non-wakefulness (below the midpoint threshold value) from periods of wakefulness (above the midpoint threshold value), while the quarter point between these two values was calculated to further separate periods of non-wakefulness into active sleep (below the quarter point threshold value) or a sleep-wake transitory state (above the quarter point threshold value but below the midpoint threshold value). Once these thresholds were determined, the entire length of data was divided into 1 s non-overlapping bins and the average filtered rectified EMG signal was determined for each. A hypnogram was then created by automatically applying the threshold-derived criteria to the binned averaged data. Data bins scored as being active sleep were further analyzed to determine the presence of muscle twitches; this was accomplished by automatically identifying data points with values exceeding the mean + 5 x standard deviation value determined from the low EMG tone representative samples. As a final step, the hypnogram and filtered rectified EMG signal data were plotted and manually inspected to ensure the accuracy of results. The hypnogram was then incorporated in the final NWB:N file to serve in the definition of the epochs of wakefulness and active sleep.

Analysis of calcium imaging data in the NWB format using CICADA. Analysis was performed using CICADA (Cossart lab Gitlab, group ID 5948056, Project ID: 14048984), a custom-made open-source python toolbox allowing for the automatic analysis of calcium imaging data in the NWB: N format. CICADA offers a user-friendly graphical user interface allowing the user i) to select the NWB files of the recording sessions to include in a given analysis, ii) to select the analysis to run and set up the parameters iii) to generate result tables and/or ready to use figures. In addition, each analysis run in CICADA generates a configuration file that can be loaded in CICADA with the option ‘Load a set of parameters’ allowing for the replication of the analysis. CICADA can be installed following the installation guidelines presented at <https://gitlab.com/cossartlab/cicada>.

Calcium transient frequency analysis. Analysis launched from CICADA ‘Transient’s frequency’ analysis. The transient frequency for each cell was computed using the count of calcium transient onsets divided by the duration of the recording and was then averaged across all cells imaged in one given mouse pup across one or more imaging sessions.

Synchronous Calcium Event (SCE) detection. Analysis launched from CICADA ‘SCE description’ analysis. SCEs were defined as the imaging frames within which the number of co-active cells

exceeded the chance level as estimated using a reshuffling method. Briefly, an independent circular shift was applied to each cell to obtain 300 surrogate raster plots. We computed the 99th percentile of the distribution of the number of co-active cells from these surrogates and used this value as a threshold to define the minimal number of co-active cells in a SCE. Peak of synchrony above this threshold separated by at least 5 imaging frames (500 ms) were defined as SCE frames. To compute the percentage of transients within SCEs we counted, for each cell, the number of its calcium transients (from onset to peak) crossing SCE frames and divided it by its total number of calcium transients. We averaged the obtained values over all the cells imaged per animal.

Peri-Movement-Time-Histograms (PMTH). Analysis launched from CICADA ‘Population level PSTH’ analysis. A 20-second-long time-window centered on movement onset was used. For each movement within an imaging session, the number of cells activated or the sum of all cells fluorescence was calculated for each time bin in that 20 seconds long window. We obtain as many values as movements per time bin; for each individual imaging session the 25th, the median and 75th percentiles of the distributions of these values per time bin are computed and divided by the number of imaged cells. To display the percentage of active cells at a given time bin, these values were multiplied by 100. To combine imaging sessions in an age group (*i.e.* P5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) all the median PMTHs from individual imaging sessions belonging to the given group were stacked and we represented at each time bin the 25th percentile, the median and the 75th percentile value of these median PMTHs. To evaluate chance level around movement onsets, 500 surrogate raster plots per imaging session were computed, and the above procedure was used to obtain chance level in each imaging session and then grouped. To obtain each surrogate raster plot, the activity of each imaged cell was translated by a randomly selected integer (between 1 and the total number of frames). We used the 95th percentile of the surrogate PMTH to conclude on significant activation and the 5th percentile to conclude on significant activity reduction. PMTH obtained from fluorescence signals were built from DF/F calcium traces.

Movement-related inhibition. Analysis launched from CICADA ‘Activity ratio around epochs’ analysis. A 4 seconds long window centered on the onset of movements was used. The total number of cells activated during this time period was calculated. If less than 40 % of these cells were activated within 2 seconds following movement onset, the movement was classified as an ‘inhibiting’ movement. This procedure was applied to all detected movements to obtain for each mouse pup the proportion of ‘inhibiting’ movements.

Movement- and immobility-associated cells. Analysis launched from CICADA ‘Epoch associated cells’ analysis. The number of transients per cell occurring during movement or immobility was calculated. These transient onsets were then circularly shifted 100 times and the same calculation was performed on each roll. We used the 99th percentile of this distribution as a threshold above which the

cell was considered as associated with movement or immobility. Finally, the proportion of cells associated with rest or immobility was calculated for each imaged mouse.

Statistics. Statistical tests were performed using GraphPad (Prism).

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Evolution of CA1 dynamics during the first two postnatal weeks

(A). Schematic of the experimental timeline. On postnatal day 0 (P0), 2 μ L of a non-diluted viral solution were injected in the left lateral ventricle of mouse pups. From five to twelve days after injection (P5-P12), acute surgery for window implantation above the corpus callosum was performed and followed by 2-photon calcium imaging recordings. Top panel: Four example recordings are shown to illustrate the imaging fields of view in the *stratum pyramidale* of the CA1 region of the hippocampus (scale bar: 100 μ m). Middle panel: Contour maps showing the cells detected using Suite2p in the corresponding fields of view. Bottom panel: Raster plots inferred by DeepCINAC activity classifier, showing 300 randomly selected cells over the first 5 minutes of recording obtained for these imaging sessions (P5, P7, P10, P12, see full raster plots for these imaging sessions in **Figure 1 - figure supplement 1D**). In the raster plot from the P5 mouse the blue rectangle illustrates one synchronous calcium event (SCE). Scale bar for time is 1 min. CICADA configuration files to reproduce example raster plots and cell contours are available in **Figure 1 - Source Data 1. (B).** Evolution of the ratio of calcium transients within SCEs over the total number of transients across age. Each dot represents a mouse pup and is color coded from light gray (P5) to black (P12), the open blue circles represent the median of the age group. The red line represents the linear fit of the data with $r^2=0.78$, $p<0.0001$ (N=32 pups). Results to build the distribution as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 1 - Source Data 1. (C).** Evolution of the number of transients per minute across the first two postnatal weeks. Each dot represents the mean transient frequency from all cells imaged in one animal and is color coded from light gray (P5) to black (P12). The red line represents the nonlinear fit (4th order polynomial, least squares method) of the data with $r^2=0.30$ (N=32 pups). The open blue circles represent the median of the age group. Results to build the distribution as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 1 - Source Data 1.**

Figure 2: Linking CA1 dynamics to movement during the first two postnatal weeks.

(A). Peri-Movement-Time-Histograms (PMTH) representing the percentage of active cells centered on the onset of the mouse movements. The dark line indicates the median value, the two thick grey lines represent the 25th and 75th percentiles from the distribution made of all median PMTHs from the

sessions included in the group. Overall are included: P5: N=4, n=8, P6: N=3, n=5; P7: N=5, n=12; P8: N=5, n=8; P9: N=5, n=11; P10: N=1, n=1; P11: N=1, n=1; P12: N=5, n=7 (N: number of mice, n: number of imaging sessions). In all panels, the thin straight gray lines represent the 5th percentile, the median and the 95th percentile of the distribution made of all median PMTHs resulting from surrogate raster plots from the sessions included in the group. Black stars indicate that the median value is above the 95th percentile or below the 5th percentile from the surrogates. Results to build the PMTH as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 2 - Source Data 1. (B)**. Distribution of post-movement activity across age. Each boxplot is built from all detected movements for the given age group. Whiskers represent the 5th and 95th percentiles with post-movement activity falling above or below represented as small dots. The average post-movement activity observed for each mouse pup is represented by the large dots color coded from light gray (P5) to black (P12). The red area illustrates the movement falling in the category of ‘inhibiting’ movements. P5: 4 mice, 1519 movements, P6: 3 mice, 766 movements, P7: 5 mice, 2067 movements, P8: 5 mice, 1105 movements, P9: 5 mice, 1272 movements, P10: 1 mouse, 83 movements, P11: 1 mouse, 57 movements, P12: 3 mice, 493 movements. Global effect of age was found significant (Anova, 8 groups, $F=107.7$, $p\text{-value}<0.0001$). Comparison between age groups shows that except all 3 possible pairs made of P10-P11-P12 and the P8-P9 pair, all pairs were significantly different ($p\text{-value}<0.005$, post hoc Bonferroni’s multiple comparison test). Results to build the distributions as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 2 - Source Data 1. (C)**. Distribution of the proportion of ‘inhibiting’ movements across age. Each dot represents a mouse pup and is color coded from light gray (P5) to black (P12). The open blue circles represent the median of the age group. The red line shows a sigmoidal fit with $V50=9.015$, $r^2=0.75$ (least squares method). Results to build the distribution as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 2 - Source Data 1. (D)**. Distribution of the proportion of significantly immobility-associated cells as a function of age. Each dot represents a mouse and is color coded from light gray (P5) to black (P12). The open blue circles represent the median of the age group. The red line shows a sigmoidal fit with $V50=9.022$, $r^2=0.55$ (least squares method). Results to build the distribution as well as CICADA configuration file to reproduce the analysis are available in **Figure 2 - Source Data 1**.

Figure 3: Differential recruitment of CA1 glutamatergic and GABAergic neurons

(A). Top panel: Imaged field of view and associated raster plot from an example imaging session in the *stratum pyramidale* from one P5 *Gad1^{Cre/+}* mouse pup (scale bar = 100 μ m). Imaged neurons expressed GCaMP6s. Interneurons were identified by the Cre-dependent expression of the red reporter tdTomato. In the raster plot neurons are sorted according to their identification as pyramidal

cells (black) or interneurons (red), vertical gray lines indicate movements of the mouse. Scale bar: 60 seconds. Bottom panel: PMTHs for pyramidal cells and interneurons combining all imaging sessions from mice aged between P5 and P8 (N=17 mice, n=33 imaging sessions). The dark line indicates the median value and the thick grey lines represent the 25th and 75th percentiles from the distribution made of all median PMTH obtained from the sessions included in the group. Thin gray lines represent the 5th, median and 95th from the distribution made of all median PMTH obtained from surrogate raster plots from the sessions included in the group. Black stars indicate that the median value is above the 95th percentile or below the 5th percentile from the surrogate dataset **(B)**. Same as (A). But illustration is made with one P12 *Gad1*^{Cre/+} mouse pup and PMTHs are built with all imaging sessions from pups aged between P10 and P12 (N=7 mice, n=9 imaging sessions). Note the presence of red labeled processes in the neuropil of the *stratum pyramidale* of P12 in contrast to P5. Results to build the PMTHs as well as CICADA configuration files to reproduce the analysis are available in **Figure 3 - Source Data 1**.

Figure 4: Emergence of perisomatic GABAergic innervation

(A). Representative example confocal images of the CA1 region in a P7 (left) and a P11 (right) mouse pup. DAPI staining was used to delineate the *stratum pyramidale* (sp) from the *stratum radiatum* (sr) and *stratum oriens* (so, top row). Synaptotagmin-2 labeling (Syt2) is shown in the top and bottom rows. Illustrated examples are indicated by red dots in the associated quantification in (B). Scale bar= 20 μ m. **(B)**. Fraction of the pyramidal cell layer covered by Syt2 positive labeling as a function of age. Each gray dot represents the average percentage of coverage from two images taken in the CA1 region of a hippocampal slice. Open black dots are the average values across brain slices from one mouse pup. Blue arrows indicate the slices used for illustration in (A). A significant effect of age was detected (One-Way Anova, $F=13.11$, $p=0.0005$, 3 mice per age group). Multiple comparison test shows a significant difference between age groups (Bonferroni's test, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$). **(C)**. Averaged image of a field of view in the pyramidal cell layer of a P9 *Gad1*^{Cre/+} mouse pup injected with a Cre-dependent Axon-GCaMP6s indicator (left) and the segmented image resulting from PyAmnesia (right). **(D)**. PMTH showing the DF/F signal centered on the onsets of animal movement (N=3 mice, n=3 imaging sessions). The dark gray line indicates the median value from the surrogate. Results obtained from surrogates are represented by light gray lines. Black stars indicate that the median value is above the median from the surrogate.

Figure 5: Modeling the effects of perisomatic inhibition on pyramidal cell response

(A). The model consists of two populations, Excitatory (E) and Inhibitory (I) receiving feedforward input I_{ext} . The interaction strengths, J_{ab} represent the effect of the activity of population b on a. We study the effects of perisomatic inhibition on the activity of pyramidal cells by varying the parameter J_{EI} (ie the number of I to E connections). For the rate model, the overall scale of the rates is arbitrary. For the LIF model, the parameters were tuned to match the percentages of active cells per experimental bin (100ms). (B). PMTH, response of excitatory neurons to pulse input in the rate model and LIF network. (C). Cross-correlations during periods of immobility, in experimental data (left), rate model (middle), and LIF network (right). In the rate model, dotted lines are the predicted correlation from the analytic expressions and solid lines are the results from numerical integration. In all the simulations, the signals were convolved with an exponential kernel of characteristic time 2s to account for GCaMP6s decay time.

Table 1

Details on the 62 imaging sessions from the 35 mouse pups showing the number of cells recorded in each session and how they were used in the main figures. In main figure 3A, * shows mouse pups that are used for illustration. Y: included in the panel, N: not included.

Table 1 – table supplement 1

Details on the 62 imaging sessions from the 35 mouse pups showing the number of cells recorded in each session and how they were used in the main figures. In main figure 3A, * shows mouse pups that are used for illustration. Y: included in the panel, N: not included.

Figure 1 - figure supplement 1

(A). Distribution of the number of cells imaged in each field of view as a function of age. Each dot represents a field view and is color coded from light gray (P5) to black (P12). The open blue circles represent the median of each group. No effect of age was observed on the number of imaged cells (Kruskal-Wallis test, 8 groups, KW stat = 11.45, p-value = 0.12). (B). Quantification of the sleep wake cycle in 4 imaging sessions from 2 mouse pups (P5 and P6) (right panel) with one example of EMG recording and resulting hypnogram. Red rectangle represents an enlargement of 100s of recordings of nuchal EMG. (C). Top left panels: Example of the electrophysiological recording done in the ipsi (hippocampus with window implant) and contralateral (intact hippocampus) hippocampi. Use of

multisite silicon probe allowed simultaneous recordings in different hippocampal layers (stratum oriens (so), pyramidal (sp), radiatum (sr) and lacunosum moleculare (slm)). The eSW is marked by an asterisk. Second panel from the left: box plot displays the eSW occurrence. Each dot represents the eSW rate per minute in a mouse pup. Signed sum rank test (N=6), p-value=0.39. Box plots show median, the bottom and top edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles, the whiskers extend to the most extreme data points not considered outliers. Top right panels: Cooccurrence of eSWs detected in both hippocampi. **(Bottom panels)**. Developmental changes in power spectral density of the recorded LFP in the ipsi (hippocampus with window implant) and contralateral (intact hippocampus) hippocampi. Gray and black lines are the averages between the animals of P6-8 and P11 age ranges, respectively. Shading shows jackknife standard deviation. Note, presence of peak in theta frequency band (4-7 Hz) in P11 animals. **(D)**. Raster plots from the imaging sessions used for illustration in Figure 1A, showing all cells over the full recording, scale bar is 2 minutes. **(E)**. Average difference of neuron transient frequency per mouse between the first and the last quarters of each imaging sessions showing the stability over the recording. Each dot is an average per mouse (N=31). **(F)**. Peri-Movement-Time-Histograms (PMTH) representing the percentage of active cells centered on the onset of the movements of the ipsilateral limbs (top panel) and contralateral limbs (bottom panel). The dark line indicates the median value, the two thick grey lines represent the 25th and 75th percentiles from the distribution made of all median PMTHs from the sessions included in the group (P5-8, N=5 mice, n=6 imaging sessions). Black star indicates that the median value is above the 95th percentile from the surrogates.

Figure 2 - figure supplement 1

(A). PMTHs grouped by age showing the evolution of the DF / F signal centered around movement onsets. The dark line indicates the median value, the two thick grey lines represent the 25th and 75th percentiles from the distribution made of all median PMTHs from the sessions included in the group. Black stars indicate that the median DF / F from the grouped sessions exceed the median DF / F from surrogate data. **(B)**. PMTHs for each age group built on twitches only (top row) or on complex movements only (bottom row). Procedure to group sessions is similar to the one described in Figure 2 **(C)**. PMTHs showing the evolution of the proportion of active cells (top row) or the DF / F signal (bottom row) for one P5 mouse pup (including 2 imaging sessions) combining all detected movements during REM sleep ('P5 -REM') or all detected movement during Wakefulness ('P5 -AWAKE'). **(D)**. Definition of the post-movement activity. **(E)**. Distribution of the proportion of cells significantly associated with movement as a function of age. Each dot represents a mouse pup and is color coded from light gray (P5) to black (P12). The open blue circles represent the median for each group.

964

965 **Figure 3 - figure supplement 1**

966 (A). Top row: confocal images taken from a 69 μm z-stack (z-step: 1.5 μm) of a brain slice from a
 967 *Gad1^{Cre/+}* mouse pup injected with both AAV9-FLEX-tdTomato and AAV1.hSyn.GCaMP6s showing
 968 the co-infection between tdTomato and GCaMP6s in hippocampal interneurons. Bottom row:
 969 maximum intensity projections of the example z-stack showed in (A). On the maximal intensity
 970 projection from tdTomato signal white arrows indicate interneurons not expressing GCaMP6s, gray
 971 arrows indicate interneurons expressing GCaMP6s. The proportion of tdTomato cells expressing
 972 GCaMP6s is shown on the plot for each layer of the region CA1 of the hippocampus. The proportion
 973 of tdTomato cells expressing GCaMP6s *in vivo* not only take into account the co-expression of the
 974 two but represent the proportion of tdTomato cells having a GCaMP6s signal that was not classified
 975 as ‘noise’ explaining the relatively low proportion in comparison with the observed co-infection rate.
 976 Scale bars= 50 μm . (B). Two photon calcium imaging field of view (FOV) from P7 *Gad1^{Cre/+}* mice
 977 co-infected with ubiquitous GCaMP6s and Cre-Dependant tdTomato viruses. Top left panel shows
 978 averaged FOV from tdTomato labelled GABAergic neurons. Middle panel shows averaged FOV for
 979 GCaMP6s labelling. Dark red arrows indicate labelled interneurons. Light red arrows indicate inferred
 980 interneurons. Right panel, shows the contour map for GCaMP6s FOV with color coded interneurons.
 981 (C). Reproduced from Denis et al., 2020, breakdown of the number of cells predicted in each category
 982 compared to the ground truth. (D). Evolution of the number of transients per minute observed in
 983 ‘labelled’ interneurons and ‘inferred’ interneurons from P5 to P12. Each dot represents the average
 984 obtained from one mouse and is color coded from light gray (P5) to black (P12). Filled dots represent
 985 ‘inferred’ interneurons, open dots represent ‘labelled’ interneurons. (E). PMTHs combined all
 986 imaging sessions between P5 and P12 (N=15 mice, n=24 imaging sessions showing the activation
 987 after movement of both ‘labelled’ and ‘inferred’ interneurons using the DF / F signal. Black stars
 988 indicate that the median value is above the 95th percentile or below the 5th percentile from the
 989 surrogates. In the cases of DF/F, black stars indicate that the median value is above the median from
 990 the surrogate.

991

992 **Figure 3 - figure supplement 2**

993 (A): PMTHs for pyramidal cells and interneurons combining all imaging sessions from mice aged
 994 between P5 and P8 (N=17 mice, n=33 imaging sessions). The dark line indicates the median value
 995 and the thick grey lines represent the 25th and 75th percentiles from the distribution made of all
 996 median PMTH obtained from the sessions included in the group. Thin gray line represents the median

from the distribution made of all median PMTHs obtained from surrogate raster plots from the sessions included in the group. Black stars indicate that the median value is above or below the median from the surrogates **(B)**. Same as (A). But PMTHs are built with all imaging sessions from pups aged between P10 and P12 (N=7 mice, n=9 imaging sessions). Black stars indicate that the median value is above or below the median from the surrogates.

Figure 3 - figure supplement 3

(A). Experimental timeline used to investigate the inputs received by pyramidal cells (*Emx1Cre* mice) and interneurons (*GAD1* mice) during the first postnatal week (early group). At P0 and P5 we injected the helper virus AAV1-hSyn-FLEX-nGToG-WPRE3 and the rabies SAD-B19-RVdG-mCherry into the hippocampus of *Gad1^{Cre/+}* (Figure 3B) mice and *Emx1^{Cre/+}* mice (Figure 3C) respectively. Brains are next collected for histological/anatomical analysis at P9. **(B)**. Confocal images from early group *Gad1^{Cre/+}* mice showing the injection sites in the dorsal hippocampus on sagittal slices at lower magnification (top left, scale bar= 1 mm), and higher magnification (top right, scale bar=100 μ m). Primo infected cells are labelled in green, the starter cell indicated by the arrow shows co-expression of the helper virus (green) and rabies virus (red). Presynaptic cells, labelled only in red, are localized in the entorhinal cortex (bottom left, scale bar= 1 mm) and in the medial septum (bottom right, scale bar= 1 mm). Hpc= Hippocampus; Ent. Ctx= Entorhinal Cortex; MS= Medial Septum **(C)**. same as in (B) but for *Emx1Cre* mice. Scale bars from top left to bottom right: 200 μ m, 100 μ m, 500 μ m, 100 μ m and 500 μ m. Middle bottom image is a higher magnification of the bottom left panel. **(D)**. Same as in (A) but for the late group (P9-P13). **(E)**. Same as in (B) but for the late group. Scale bars from top left to bottom right: 1 mm, 100 μ m, 1 mm and 1mm. **(F)**. Same as in (C) but for the late group. Scale bars from top left to bottom right: 200 μ m, 100 μ m, 500 μ m, and 500 μ m.

Figure 4 - figure supplement 1.

(A). 2-photon calcium images of tdTomato signal from 3 consecutive z-step in the stratum oriens (top row) and stratum pyramidale (bottom row) in *Gad1^{Cre/+}* mouse pups injected with AAV9-FLEX-tdTomato. **(B)**. Three different zstep from the same 2-photon FOV (P6 *Gad1^{Cre/+}* infected with pAAV-hSynapsin1-FLEEx-axon-GCaMP6s). In the middle panel the white dashed line shows the delimitation between stratum oriens and stratum pyramidale.

Figure 5 – figure supplement 1

(A). Movement duration histograms. These histograms were fit by log-normal distributions. For the P5-8 datasets, the mean and standard deviation of the logarithm of the duration were respectively: $\mu = -0.37$ and $\sigma = 0.64$. For the P9-12 datasets, they were: $\mu = -0.05$ and $\sigma = 0.86$. In the simulation, they were chosen to be: $\mu = -0.2$ and $\sigma = 0.8$. (B). PMTHs of the interneurons predicted by the rate and LIF models. (C). Auto-correlograms of the activity for the pyramidal cells and interneurons.

Video

Video 1-3: Three examples of calcium imaging movies from P5 mouse pups centered on the onset of a twitch. The twitch is indicated by T on the upper left corner of the movie. Imaging 2 times speed up.

Video 4-6: Three examples of calcium imaging movies from P12 mouse pups centered on the onset of a complex movement. The complex movement is indicated by M on the upper left corner of the movie. Imaging 2 times speed up.

Video 7: Calcium imaging movie from the FOV showed in the middle panel of Figure 4 - figure supplement 1B.

SOURCE DATA

Figure 1 - Source Data 1. Contains 3 folders. **1A:** contains the 4 raw '.tiff' files illustrating the field of views and the CICADA configuration files necessary to plot the contours map and raster plots used for the illustration. **1B:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot the evolution of the transient in SCE and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis. **1C:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot the evolution of the transient per minute and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis.

Figure 2 - Source Data 1. Contains 4 folders. **2A:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot all the PMTHs (in Figure 2A) and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis. **2B:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot Figure 2B and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis. **2C:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot Figure 2C and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis. **2D:** contain (in an '.xlsx' file) the numerical data used to plot Figure 2D and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis.

Figure 3 - Source Data 1. Contains 3 folders. **‘example_FoVs’**: contains the ‘.tiff’ images used for illustration in Figure 3. **‘example_raster_plots’**: contains the 2 CICADA configuration files necessary to reproduce the raster plots used for illustration in Figure 3. **‘psth’s’**: contains (in an ‘.xlsx’ file) the numerical data used to plot Figure 3 PMTHs and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis.

Figure 4 - Source Data 1. Contains 4 folders. **4A**: contains ‘.tiff’ images used for illustration in Figure 4A. **4B**: contains the numerical data of the plot in Figure 4B. **4C**: contains the CICADA configuration file necessary to plot the contour map shown in Figure 4C. **4D**: contains (in an ‘.xlsx’ file) the numerical data used to plot Figure 4C PMTH and the CICADA configuration file necessary to reproduce the analysis.

Figure 5 - Source data 1. Table of the model parameter values.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Research Council under the European Union’s, Horizon 2020 research and innovation program Grant#646925, the Fondation Bettencourt Schueller, and a NWB seed grant # R20046AA. The project leading to this publication has received funding from the « Investissements d’Avenir » French Government program managed by the French National Research Agency (ANR-16-CONV-0001) and from Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*MIDEX. R.F.D. was funded by the “Ministere de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” and by the Fondation pour la Recherche Médicale Grant FDT202106012824. E.L. was funded by the “Ministere de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” and by A*Midex foundation and the French National Research Agency funded by the French Government « Investissements d’Avenir » program (NeuroSchool, nEURO*AMU, ANR-17-EURE-0029 grant). J.D. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale Grant FDM20170638339. M.P was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale Grant ARF20160936186. T. D and T. S. were funded by « Investissements d’Avenir » French Government program managed by the French National Research Agency (ANR-16-CONV-0001) and from Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*MIDEX. We would like to thank Dr. Pierre-Pascal Lenck-Santini for providing valuable feedback on our research project. We thank S Pellegrino-Corby, F Michel and S brustlein from the INMED animal and imaging facilities (InMagic). We also would like to thank Marion Sicre for her help with *GAD1^{Cre/+}* experiments. We are grateful to Pr. Hannah Monyer for providing the *GAD1^{Cre/+}* mouse lines. We thank the Centre de Calcul Intensif d’Aix-Marseille for granting access to its high-performance computing resources. The rabies virus was a gift from Conzelman laboratory.

1092 **REFERENCE LIST:**

- 1093 Anastasiades PG, Butt SJB. 2012. A Role for Silent Synapses in the Development of the
 1094 Pathway from Layer 2/3 to 5 Pyramidal Cells in the Neocortex. *Journal of Neuroscience*
 1095 **32**:13085–13099. doi:10.1523/jneurosci.1262-12.2012
- 1096 Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture.
 1097 *Nature Reviews Neuroscience* **3**:728–739. doi:10.1038/nrn920
- 1098 Bezair MJ, Soltesz I. 2013. Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base
 1099 for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus* **23**:751–785.
 1100 doi:10.1002/hipo.22141
- 1101 Blumberg MS, Sokoloff G, Tiriach A, Rio-Bermudez CD. 2015. A valuable and promising
 1102 method for recording brain activity in behaving newborn rodents. *Dev Psychobiol* **57**:506–
 1103 517. doi:10.1002/dev.21305
- 1104 Bocchio M, Gouny C, Angulo-Garcia D, Toulat T, Tressard T, Quiroli E, Baude A, Cossart R.
 1105 2020. Hippocampal hub neurons maintain distinct connectivity throughout their lifetime.
 1106 *Nature Communications* **11**:1–19. doi:10.1038/s41467-020-18432-6
- 1107 Buhl DL, Buzsáki G. 2005. Developmental emergence of hippocampal fast-field “ripple”
 1108 oscillations in the behaving rat pups. *Neuroscience* **134**:1423–1430.
 1109 doi:10.1016/j.neuroscience.2005.05.030
- 1110 Buzsáki G. 2015. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic
 1111 memory and planning. *Hippocampus* **25**:1073–1188. doi:10.1002/hipo.22488
- 1112 Buzsáki G, Moser EI. 2013. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-
 1113 entorhinal system. *Nature Neuroscience* **16**:130–138. doi:10.1038/nn.3304
- 1114 Caviness VS. 1973. Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal
 1115 and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *The Journal of Comparative*
 1116 *Neurology* **151**:113–120. doi:10.1002/cne.901510203
- 1117 Cossart R, Khazipov R. 2021. How development sculpts hippocampal circuits and function.
 1118 *Physiol Rev*. doi:10.1152/physrev.00044.2020
- 1119 *Neuronal Activity Based on Movie Visualization. Eneuro* **7**:ENEURO.0038-20.2020.
 1120 Doi:10.1523/eneuro.0038-20.2020
- 1121 Doischer D, Hosp JA, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M. 2008. Postnatal
 1122 Differentiation of Basket Cells from Slow to Fast Signaling Devices. *Journal of Neuroscience*
 1123 **28**:12956–12968. doi:10.1523/jneurosci.2890-08.2008
- 1124 Dominguez S, Ma L, Yu H, Pouchelon G, Mayer C, Spyropoulos GD, Cea C, Buzsáki G,
 1125 Fishell G, Khodagholy D, Gelinás JN. 2021. A transient postnatal quiescent period precedes
 1126 emergence of mature cortical dynamics 1–34. doi:10.1101/2021.02.17.430487
- 1127 Donato F, Jacobsen RI, Moser M-B, Moser EI. 2017. Stellate cells drive maturation of the
 1128 entorhinal-hippocampal circuit. *Science* eaai8178-17. doi:10.1126/science.aai8178
- 1129 Dooley JC, Blumberg MS. 2018. Developmental “awakening” of primary motor cortex to the
 1130 sensory consequences of movement. *Elife* **7**:e41841. doi:10.7554/elife.41841
- 1131 Dooley JC, Glanz RM, Sokoloff G, Blumberg MS. 2020. Self-Generated Whisker Movements
 1132 Drive State-Dependent Sensory Input to Developing Barrel Cortex. *Curr Biol* **30**:2404-
 1133 2410.e4. doi:10.1016/j.cub.2020.04.045
- 1134 Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A. 1996. Long-term potentiation and functional synapse
 1135 induction in developing hippocampus. *Nature* **381**:71–75. doi:10.1038/381071a0
- 1136 Farooq U, Dragoi G. 2019. Emergence of preconfigured and plastic time-compressed
 1137 sequences in early postnatal development. *Science* **363**:168–173.

doi:10.1126/science.aav0502

Fuhrmann F, Justus D, Sosulina L, Kaneko H, Beutel T, Friedrichs D, Schoch S, Schwarz MK, Fuhrmann M, Remy S. 2015. Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron* **86**:1253–1264. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.001

Gardiner, C. W. (1985). *Handbook of stochastic methods* (Vol. 3). Berlin: Springer. doi:10.1080/713821616

Gogolla N, Takesian AE, Feng G, Fagioli M, Hensch TK. 2014. Sensory Integration in Mouse Insular Cortex Reflects GABA Circuit Maturation. *Neuron* **83**:894–905. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.033

Golshani P, Goncalves JT, Khoshkhoo S, Mostany R, Smirnakis S, Portera-Cailliau C. 2009. Internally Mediated Developmental Desynchronization of Neocortical Network Activity. *Journal of Neuroscience* 29:10890–10899. doi:10.1523/jneurosci.2012-09.2009

Graf J, Zhang C, Marguet SL, Herrmann T, Flossmann T, Hinsch R, Rahmati V, Guenther M, Frahm C, Urbach A, Neves RM, Witte OW, Kiebel SJ, Isbrandt D, Hübner CA, Holthoff K, Kirmse K. 2021. A limited role of NKCC1 in telencephalic glutamatergic neurons for developing hippocampal network dynamics and behavior. *Proc National Acad Sci* **118**:e2014784118. doi:10.1073/pnas.2014784118

Gramsbergen A, Schwartz P, Prechtl HFR. 1970. The postnatal development of behavioral states in the rat. *Dev Psychobiol* 3:267–280. doi:10.1002/dev.420030407

Hopfield J, Tank D. 2005. Computing with neural circuits: a model. *Science* **233**:625–633. doi:10.1126/science.3755256

Hopfield JJ. 1982. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc National Acad Sci* **79**:2554–2558. doi:10.1073/pnas.79.8.2554

Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M. 2015. Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plast* **2015**:1–12. doi:10.1155/2015/256389

Inácio AR, Nasretudinov A, Lebedeva J, Khazipov R. 2016. Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord. *Nature Communications* 7:13060. doi:10.1038/ncomms13060

Jiang M, Oliva AA, Lam T, Swann JW. 2001. GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates. *The Journal of Comparative Neurology* **439**:176–192. doi:10.1002/cne.1341

Jouvet-Mounier D, Astic L. 1968. [Study of the course of sleep in the young rat during the 1st postnatal month]. *Comptes Rendus Des Séances De La Société De Biologie Et De Ses Fil* **162**:119–23.

Jouvet Mounier D, Astic L, Lacote D. 1969. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* 2:216–239. doi:10.1002/dev.420020407

Jurgensen S, Castillo PE. 2015. Selective Dysregulation of Hippocampal Inhibition in the Mouse Lacking Autism Candidate Gene CNTNAP2. *J Neurosci* **35**:14681–14687. doi:10.1523/jneurosci.1666-15.2015

Karlsson KAE, Mohns EJ, Prisco GV di, Blumberg MS. 2006. On the co-occurrence of startles and hippocampal sharp waves in newborn rats. *Hippocampus* 16:959–965. doi:10.1002/hipo.20224

Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. 2004. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *European*

1185 *Journal of Neuroscience* **19**:590–600. doi:10.1111/j.0953-816x.2003.03152.x

1186 Khazipov R, Milh M. 2018. Early patterns of activity in the developing cortex: Focus on the

1187 sensorimotor system. *Semin Cell Dev Biol* **76**:120–129. doi:10.1016/j.semcdb.2017.09.014

1188 Lee S-H, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, Lovett-Barron M, Losonczy A,

1189 Soltesz I. 2014. Parvalbumin-Positive Basket Cells Differentiate among Hippocampal

1190 Pyramidal Cells. *Neuron* **82**:1129–1144. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.034

1191 Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsáki G. 2002. Correlated

1192 bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science* **296**:2049–2052.

1193 doi:10.1126/science.1071111

1194 Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia.

1195 *Nature Reviews Neuroscience* **6**:312–324. doi:10.1038/nrn1648

1196 Liu K, Kim J, Kim DW, Zhang YS, Bao H, Denaxa M, Lim S-A, Kim E, Liu C, Wickersham IR,

1197 Pachinis V, Hattar S, Song J, Brown SP, Blackshaw S. 2017. Lhx6-positive GABA-releasing

1198 neurons of the zona incerta promote sleep. *Nature Publishing Group* **548**:1–24.

1199 doi:10.1038/nature23663

1200 Marty S, Wehrlé R, Alvarez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C. 2002. Postnatal maturation

1201 of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat

1202 hippocampus: an immunocytochemical analysis. *European Journal of Neuroscience* **15**:233–

1203 245. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01854.x

1204 Milh M, Kaminska A, Huon C, Lapillonne A, Ben-Ari Y, Khazipov R. 2006. Rapid Cortical

1205 Oscillations and Early Motor Activity in Premature Human Neonate. *Cerebral Cortex*

1206 **17**:1582–1594. doi:10.1093/cercor/bhl069

1207 Miri A, Daie K, Arrenberg AB, Baier H, Aksay E, Tank DW. 2011. Spatial gradients and

1208 multidimensional dynamics in a neural integrator circuit. *Nat Neurosci* **14**:1150–1159.

1209 doi:10.1038/nn.2888

1210 Mòdol L, Bollmann Y, Tressard T, Baude A, Che A, Duan ZRS, Babij R, García NVDM,

1211 Cossart R. 2019. Assemblies of Perisomatic GABAergic Neurons in the Developing Barrel

1212 Cortex. *Neuron* **1–18**. doi:10.1016/j.neuron.2019.10.007

1213 Mohns EJ, Blumberg MS. 2010. Neocortical Activation of the Hippocampus during Sleep in

1214 Infant Rats. *Journal of Neuroscience* **30**:3438–**3449**. doi:10.1523/jneurosci.4832-09.2010

1215 Mohns EJ, Blumberg MS. 2008. Synchronous Bursts of Neuronal Activity in the Developing

1216 Hippocampus: Modulation by Active Sleep and Association with Emerging Gamma and

1217 Theta Rhythms. *Journal of Neuroscience* **28**:10134–10144. doi:10.1523/jneurosci.1967-

1218 08.2008

1219 Morozov YM, Freund TF. 2003. Postnatal development and migration of cholecystokinin-

1220 immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* **120**:923–939.

1221 doi:10.1016/s0306-4522(03)00409-3

1222 Muessig L, Lasek M, Varsavsky I, Cacucci F, Wills TJ. 2019. Coordinated Emergence of

1223 Hippocampal Replay and Theta Sequences during Post-natal Development. *Current Biology*

1224 **29**:834-840.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.01.005

1225 Murata Y, Colonnese MT. 2020. GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in

1226 vivo. *Science advances* **6**:eaba1430. doi:10.1126/sciadv.aba1430

1227 Murphy KM, Beston BR, Boley PM, Jones DG. 2005. Development of human visual cortex: A

1228 balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Dev Psychobiol* **46**:209–

1229 221. doi:10.1002/dev.20053

1230 Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, Sleboda SJ, Head JP, Ginty DD. 2016. Peripheral

1231 Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse

1232 Models of ASDs. *Cell* **166**:299–313. doi:10.1016/j.cell.2016.05.033

1233 Pachitariu M, Stringer C, Dipoppa M, Schröder S, Rossi LF, Dalgleish H, Carandini M, Harris
 1234 KD. 2017. Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *Biorxiv*
 1235 061507. doi:10.1101/061507
 1236 Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, Sandoval K, Rowitch DH, Xu
 1237 D, McQuillen PS, Garcia-Verdugo J-M, Huang EJ, Alvarez-Buylla A. 2016. Extensive
 1238 migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* **354**:aaf7073.
 1239 doi:10.1126/science.aaf7073
 1240 Paxinos, Halliday, Watson, Kassem. 2020. Atlas of the Developing Mouse Brain.
 1241 Pnevmatikakis EA, Giovannucci A. 2017. NoRMCorre: An online algorithm for piecewise
 1242 rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods* **291**:83–
 1243 94. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.07.031
 1244 Reh RK, Dias BG, Nelson CA, Kaufer D, Werker JF, Kolb B, Levine JD, Hensch TK. 2020.
 1245 Critical period regulation across multiple timescales. *Proc National Acad Sci* **117**:23242–
 1246 23251. doi:10.1073/pnas.1820836117
 1247 Rio-Bermudez CD, Blumberg MS. 2021. Sleep as a window on the sensorimotor
 1248 foundations of the developing hippocampus. *Hippocampus*. doi:10.1002/hipo.23334
 1249 Rio-Bermudez CD, Kim J, Sokoloff G, Blumberg MS. 2020. Active Sleep Promotes Coherent
 1250 Oscillatory Activity in the Cortico-Hippocampal System of Infant Rats. *Cerebral cortex (New*
 1251 *York, NY: 1991)* **30**:2070–2082. doi:10.1093/cercor/bhz223
 1252 Rio-Bermudez CD, Sokoloff G, Blumberg MS. 2015. Sensorimotor Processing in the
 1253 Newborn Rat Red Nucleus during Active Sleep. *J Neurosci* **35**:8322–8332.
 1254 doi:10.1523/jneurosci.0564-15.2015
 1255 Rochefort NL, Garaschuk O, Milos R-I, Narushima M, Marandi N, Pichler B, Kovalchuk Y,
 1256 Konnerth A. 2009. Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening.
 1257 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
 1258 **106**:15049–15054. doi:10.1073/pnas.0907660106
 1259 Soltesz I, Losonczy A. 2018. CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information
 1260 processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience* **21**:1–10. doi:10.1038/s41593-018-
 1261 0118-0
 1262 Sommeijer J-P, Levelt CN. 2012. Synaptotagmin-2 is a reliable marker for parvalbumin
 1263 positive inhibitory boutons in the mouse visual cortex. *PLoS ONE* **7**:e35323.
 1264 doi:10.1371/journal.pone.0035323
 1265 Suen CY, Wang PSP, LEE S-W, LAM L, SUEN CY. 1994. Thinning Methodologies for
 1266 Pattern Recognition. *S Mach Perc* **239**–261. doi:10.1142/9789812797858_0012
 1267 Supèr H, Soriano E. 1994. The organization of the embryonic and early postnatal murine
 1268 hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied
 1269 with the lipophilic tracer Dil. *The Journal of Comparative Neurology* **344**:101–120.
 1270 doi:10.1002/cne.903440108
 1271 Szőnyi A, Sos KE, Nyilas R, Schlingloff D, Domonkos A, Takács VT, Pósfai B, Hegedüs P,
 1272 Priestley JB, Gundlach AL, Gulyás AI, Varga V, Losonczy A, Freund TF, Nyiri G. 2019.
 1273 Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. *Science* **364**:eaaw0445-
 1274 15. doi:10.1126/science.aaw0445
 1275 Tiriac A, Blumberg MS. 2016. Gating of reafference in the external cuneate nucleus during
 1276 self-generated movements in wake but not sleep. *Elife* **5**:e18749. doi:10.7554/elife.18749
 1277 Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L. 1999. The Establishment
 1278 of GABAergic and Glutamatergic Synapses on CA1 Pyramidal Neurons is Sequential and
 1279 Correlates with the Development of the Apical Dendrite 1–11.
 1280 Valeeva G, Janackova S, Nasretidinov A, Rychkova V, Makarov R, Holmes GL, Khazipov R,

1281 Lenck-Santini P-P. 2019a. Emergence of Coordinated Activity in the Developing Entorhinal–
 1282 Hippocampal Network. *Cereb Cortex* **29**:906–920. doi:10.1093/cercor/bhy309
 1283 Valeeva G, Nasretdinov A, Rychkova V, Khazipov R. 2019b. Bilateral Synchronization of
 1284 Hippocampal Early Sharp Waves in Neonatal Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **13**:29.
 1285 doi:10.3389/fncel.2019.00029
 1286 Valero M, Cid E, Averkin RG, Aguilar J, Sanchez-Aguilera A, Viney TJ, Gomez-Dominguez
 1287 D, Bellistri E, Prida LM de la. 2015. Determinants of different deep and superficial CA1
 1288 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nature Neuroscience* **18**:1281–1290.
 1289 doi:10.1038/nn.4074
 1290 Villette V, Malvache A, Tressard T, Dupuy N, Cossart R. 2015. Internally Recurring
 1291 Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information. *Neuron*
 1292 **88**:357–366. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.052
 1293 Vinck M, Batista-Brito R, Knoblich U, Cardin JA. 2015. Arousal and Locomotion Make
 1294 Distinct Contributions to Cortical Activity Patterns and Visual Encoding. *Neuron* **86**:740–754.
 1295 doi:10.1016/j.neuron.2015.03.028
 1296 Wang DV, Yau H-J, Broker CJ, Tsou J-H, Bonci A, Ikemoto S. 2015. Mesopontine median
 1297 raphe regulates hippocampal ripple oscillation and memory consolidation. *Nature*
 1298 *Neuroscience* **18**:728–735. doi:10.1038/nn.3998
 1299 Wickersham IR, Lyon DC, Barnard RJO, Mori T, Finke S, Conzelmann K-K, Young JAT,
 1300 Callaway EM. 2007. Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single,
 1301 Genetically Targeted Neurons. *Neuron* **53**:639–647. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.033
 1302 Wolfe J, Houweling AR, Brecht M. 2010. Sparse and powerful cortical spikes. *Current*
 1303 *Opinion in Neurobiology* **20**:306–312. doi:10.1016/j.conb.2010.03.006
 1304 Yuste R. 2015. From the neuron doctrine to neural networks. *Nat Rev Neurosci* **16**:487–497.
 1305 doi:10.1038/nrn3962
 1306 Zhang G-W, Sun W-J, Zingg B, Shen L, He J, Xiong Y, Tao HW, Zhang LI. 2018. A Non-
 1307 canonical Reticular-Limbic Central Auditory Pathway via Medial Septum Contributes to Fear
 1308 Conditioning. *Neuron* **97**:406–417.e4. doi:10.1016/j.neuron.2017.12.010
 1309 Zutshi I, Valero M, Fernández-Ruiz A, Buzsáki G. 2021. Extrinsic control and intrinsic
 1310 computation in the hippocampal CA1 circuit. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2021.11.015

Appendix 1

Perisomatic inhibition onto pyramidal neurons in CA1 is established during the early stages of development. Firstly, we investigated the effect of perisomatic inhibition on response to twitch-like inputs in a rate model. It allowed us to analytically characterize and compare the changes in the dynamics of the model under the conditions of weak and strong inhibition. Secondly, we show through numerical simulations that similar changes can be observed in a more realistic spiking network model. We show that increasing the strength of perisomatic inhibition in our models can account for the experimentally observed decrease of responses to twitch like feedforward inputs.

Rate model

The rate model consists of two populations (Excitatory and Inhibitory) with interaction strengths J_{ab} , ($a, b \in E, I, J_{ab} > 0$). They receive feedforward input of strengths $J_{a0} > 0$, from an external excitatory population with average firing rate r_0 . The rates r_E, r_I represent the population-averaged activities. The time scale of their evolution is determined by τ_E and τ_I and follow:

$$\begin{pmatrix} \dot{r}_E \\ \dot{r}_I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -r_E / \tau_E \\ -r_I / \tau_I \end{pmatrix} + f \left(\begin{pmatrix} J_{EE} & -J_{EI} \\ J_{IE} & -J_{II} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_E \\ r_I \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} J_{E0} \\ J_{I0} \end{pmatrix} r_0 \right) \quad (1)$$

Where $f(x)$ is the neuronal transfer function. We choose it to be threshold-linear, i.e., $f(x) = [x]_+$. For positive x , the dynamics in matrix notation can be written as,

$$\dot{\mathbf{r}} = (\mathbf{J} - \mathbf{I} / \tau) \mathbf{r} + \mathbf{M} \mathbf{r} + \mathbf{r}_0 \quad (2)$$

The fixed point of this system is given by,

$$\mathbf{r}^* = -\mathbf{M}^{-1} \mathbf{r}_0 \quad (3)$$

Where,

$$\mathbf{M}^{-1} = \frac{1}{\det(\mathbf{M})} \begin{pmatrix} -J_{II} - \frac{1}{\tau_I} & J_{EI} \\ -J_{IE} & -J_{EE} + \frac{1}{\tau_E} \end{pmatrix} \quad (4)$$

$$\det(\mathbf{M}) = J_{EI}J_{IE} - J_{EE}J_{II} + \frac{J_{II}}{\tau_E} - \frac{J_{EE}}{\tau_I} + \frac{1}{\tau_E\tau_I} \quad (5)$$

Linear stability

The fixed point $\mathbf{r}^*$ is stable to small perturbations if the real parts of all the eigenvalues of the Jacobian matrix $\mathbf{M}(\mathbf{r}^*)$ are negative. The eigenvalues can be expressed as,

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \left(\text{Tr}(\mathbf{M}) \pm \sqrt{\text{Tr}(\mathbf{M})^2 - 4 \det(\mathbf{M})} \right) \quad (6)$$

where,

$$\text{Tr}(\mathbf{M}) = J_{EE} - J_{II} - \frac{1}{\tau_E} - \frac{1}{\tau_I} \quad (7)$$

Equivalently, the system is always stable if $\det(\mathbf{M}) > 0$ and $\text{Tr}(\mathbf{M}) < 0$.

Requiring, $r_e^* > 0$ and $r_i^* > 0$ gives the conditions,

$$(J_{II} + \frac{1}{\tau_I})J_{E0} - J_{EI}J_{I0} > 0 \implies \frac{J_{E0}}{J_{I0}} > \frac{J_{EI}}{J_{II} + 1/\tau_I} \quad (8)$$

$$J_{IE}J_{E0} - (J_{EE} - \frac{1}{\tau_E})J_{I0} > 0 \implies \frac{J_{E0}}{J_{I0}} > \frac{J_{EE} - 1/\tau_E}{J_{IE}} \quad (9)$$

$\det(M) > 0$ gives,

$$-(J_{EE} - \frac{1}{\tau_E})(J_{II} + \frac{1}{\tau_I}) + J_{EI}J_{IE} > 0 \implies \frac{J_{EI}}{J_{II} + 1/\tau_I} > \frac{J_{EE} - 1/\tau_E}{J_{IE}} \quad (10)$$

Combining the inequalities above gives the constraints for stable non-zero rates,

$$\frac{J_{E0}}{J_{I0}} > \frac{J_{EI}}{J_{II} + 1/\tau_I} > \frac{J_{EE} - 1/\tau_E}{J_{IE}} \quad (11)$$

When the solutions are stable, small perturbations $\delta \mathbf{r}$ will decay to zero. Twitches can be considered as perturbations around the fixed point. The transient response to such short impulses can be expressed as $\mathbf{r}(t) = C_1 \exp(\lambda_+ t) + C_2 \exp(\lambda_- t)$

For a system with external white noise, $\xi(t)$ as input we have:

$$\dot{\mathbf{r}} = \mathbf{M}\mathbf{r} + \mathbf{r}_0 + \sqrt{\Sigma} \xi(t) \quad (12)$$

$$\langle \xi(t) \rangle_t = 0, \quad \langle \xi(t) \xi(s) \rangle_t = \delta(t - s) \quad (13)$$

We set the off-diagonal elements to zero, i.e., $\Sigma_{ij} = 0$ if $i \neq j$. Let $\delta \mathbf{r}(t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{r}^*$, so the linearized system is,

$$\delta \dot{\mathbf{r}} = \mathbf{M} \delta \mathbf{r} + \sqrt{\Sigma} \xi(t) dt \quad (14)$$

This can be seen as a 2D Ornstein-Uhlenbeck process defined as:

$$\dot{\mathbf{x}}(t) = -\mathbf{A} \mathbf{x}(t) dt + \mathbf{B} d\mathbf{W}(t) \quad (15)$$

which is well documented (Gardiner, 1985, p 109-111) and we can immediately write down the expression for the covariance matrix $\mathbf{C}(\tau)$. With $(\mathbf{A} = -\mathbf{M})$, we have:

$$\mathbf{C}(\tau) = \langle \delta \mathbf{r}(t) \delta \mathbf{r}^T(t + \tau) \rangle = \exp(-\mathbf{A} \tau) \sigma \quad (16)$$

$$\sigma = \frac{\det \mathbf{A} \Sigma + [\mathbf{A} - \text{Tr}(\mathbf{A})\mathbf{I}] \Sigma [\mathbf{A} - \text{Tr}(\mathbf{A})\mathbf{I}]^T}{2\text{Tr}(\mathbf{A}) \det(\mathbf{A})} \quad (17)$$

Spiking model: LIF network

Excitatory and inhibitory neurons are modeled as Leaky Integrate and Fire (LIF) neurons. The LIF network consists of N_E excitatory neurons and N_I inhibitory neurons with exponentially decaying postsynaptic currents. Each neuron receives exactly K_E excitatory and K_I inhibitory inputs from randomly selected neurons in the network. And we assume that the network is sparse i.e. $K \ll N$. The evolution of the sub-threshold membrane voltage V_i^a of neuron i in population $a \in \{E, I\}$ is given by,

$$\frac{dV_i^a}{dt} = -\frac{V_i^a}{\tau_m} + I_{syn} + I_{ext} + \eta, \quad I_{syn} = \sum_{b,j} J_{ij}^{ab} S_j^{ab} \quad (18)$$

$$\frac{dS_j^{ab}}{dt} = -\frac{S_j^{ab}}{\tau_{syn}} + \sum_{i,j} \delta(t - t_j^b) \quad (19)$$

When the membrane voltage reaches the threshold, $V_{\text{threshold}}$, it is reset to V_{reset} . τ_{syn} is the synaptic time constant, t_j^b is the spike time of neuron (j, b) . The coupling strengths $J_{ij}^{ab} = J_{ab}$, if there is a connection from neuron (j, b) to (i, a) and zero otherwise. The contribution of external inputs is represented by I_{ext} . I_{syn} represents the total synaptic currents due to spikes. Spikes are modeled as delta functions.

97 If a neuron (j, b) emits a spike at time t_j^b and projects to a post-synaptic neuron (i, a) ,
 98 this will result in a change of the membrane voltage V_i^a of the post-synaptic neuron by an
 99 amount J_{ab} . The membrane voltage decays exponentially to its resting potential in a time
 100 τ_m . Each neuron receives an independent gaussian white noise of amplitude η .

101 Simulations and data analysis

102 The network simulations were conducted using custom code written in Python and C++ and
 103 all the analysis was done in Python. We use the forward Euler method to solve the set of
 104 coupled ODEs with a time step of 0.1 ms.

106 Covariance

105 Given a stationary stochastic process $\mathbf{X}_t$ with mean $\mu_X = \mathbf{E}[X_t]$, the autocovariance is given by,
 107

$$109 \quad C_{XX}(\tau) = \mathbf{E} \left[(X_t - \mu_X) (X_{t-\tau} - \mu_X) \right] \quad (20)$$

110 The covariance of X_t with another process Y_t is defined as,
 112

$$114 \quad C_{XY}(\tau) = \mathbf{E} \left[(X_t - \mu_X) (Y_{t-\tau} - \mu_Y) \right] \quad (21)$$

Figure 1

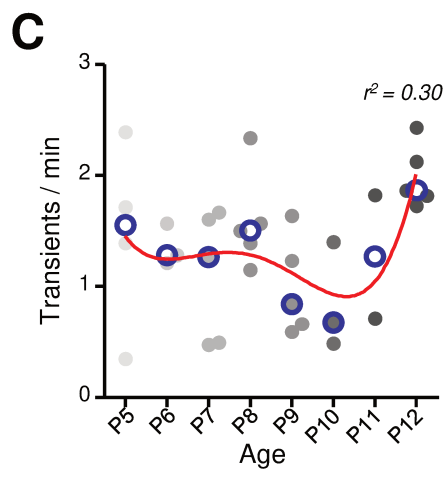
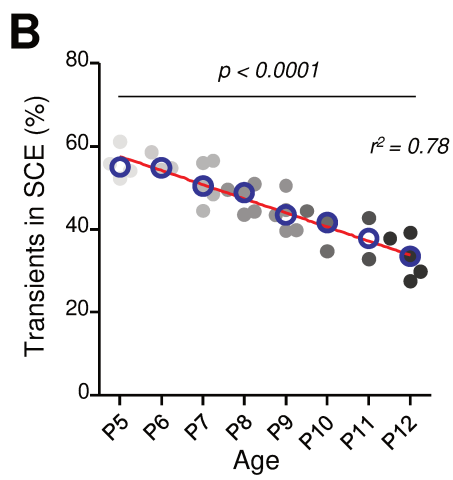
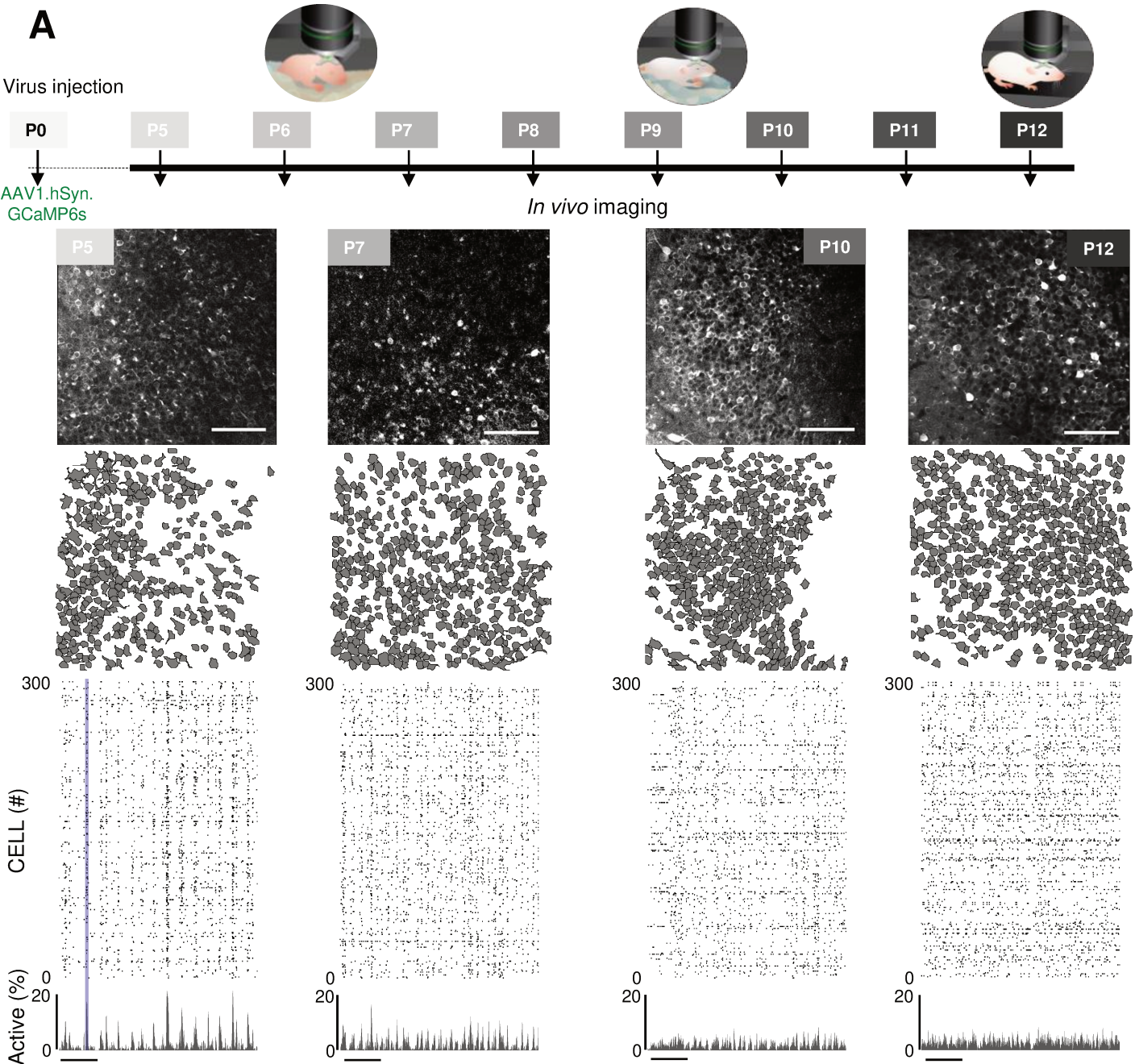
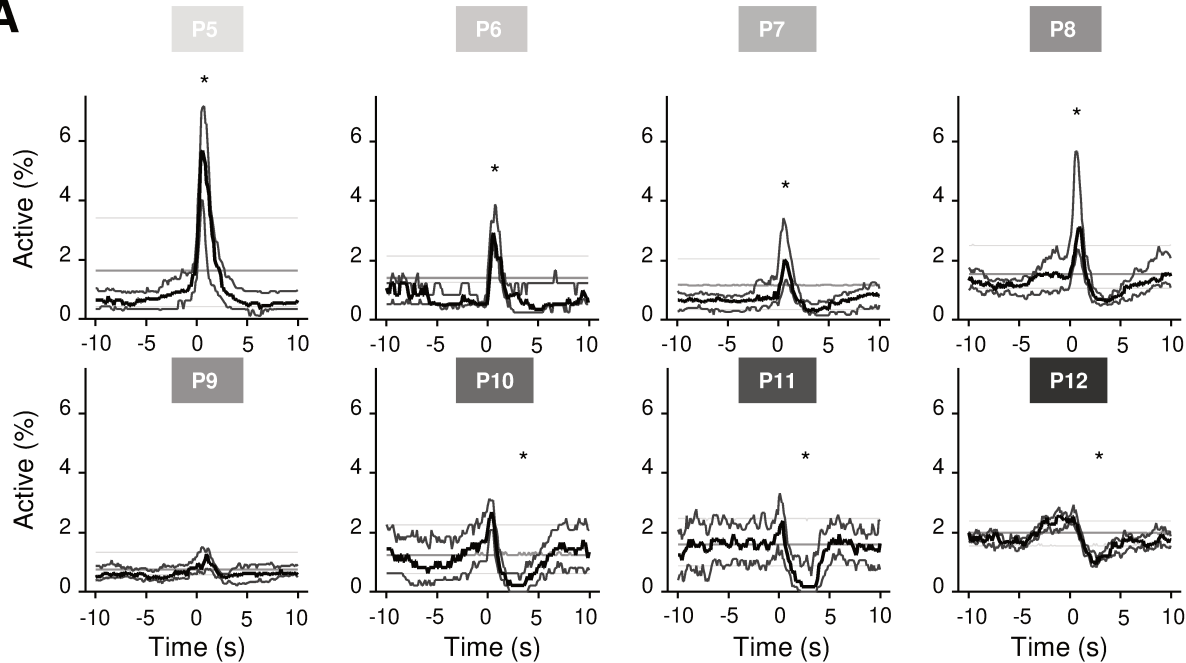
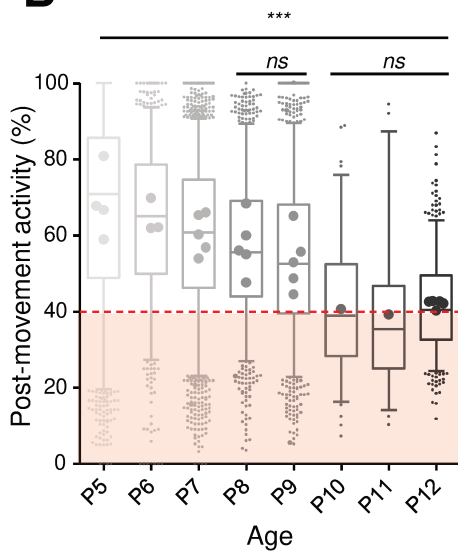


Figure 2

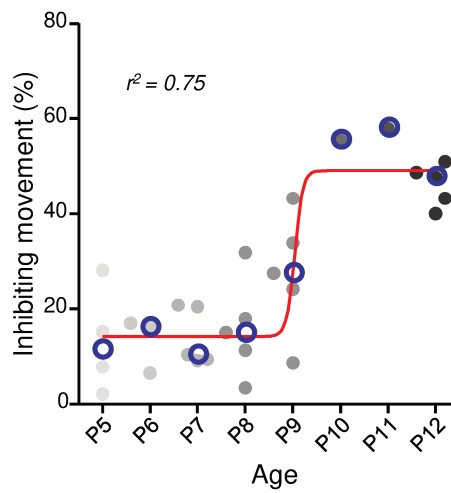
A



B



C



D

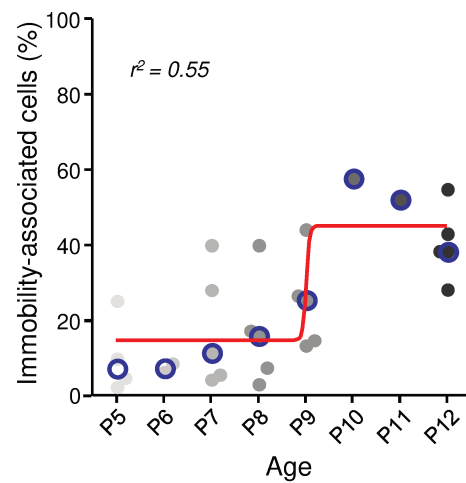
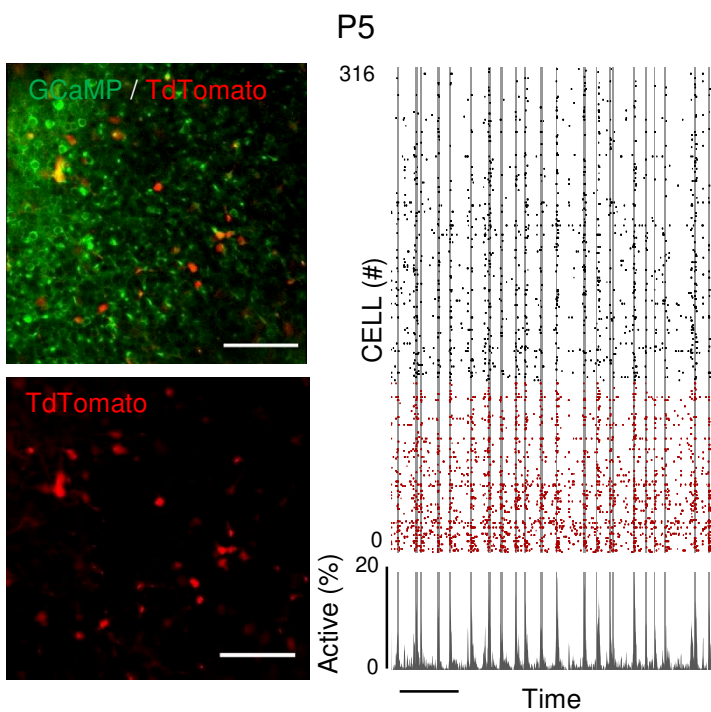


Figure 3

A



B

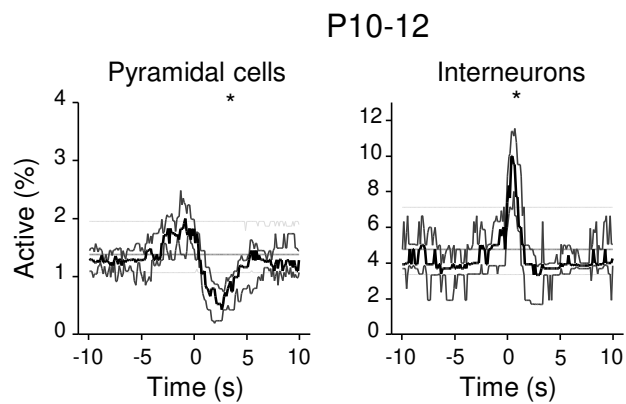
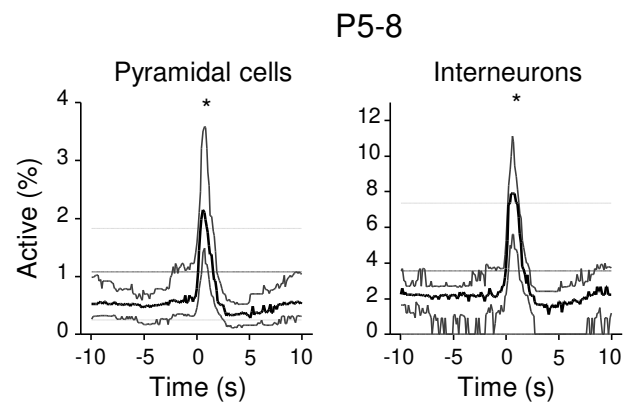
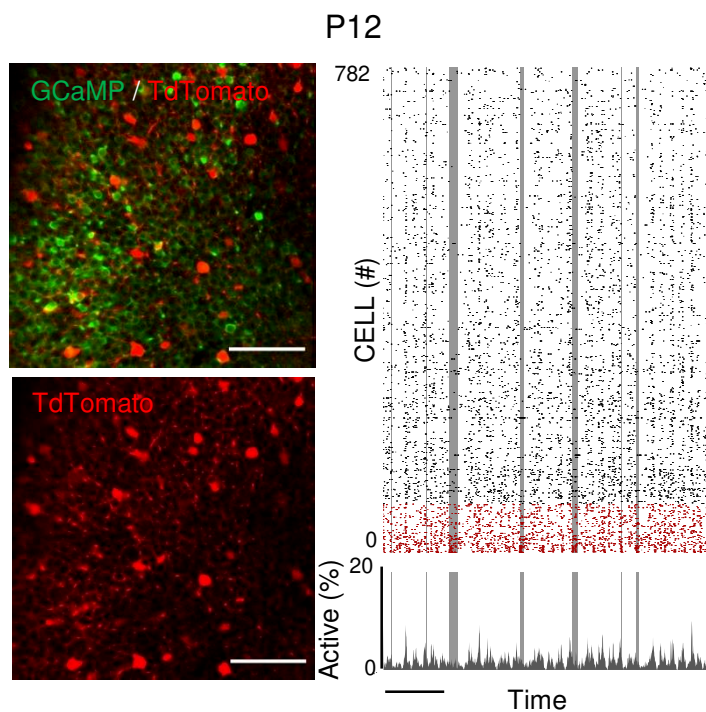
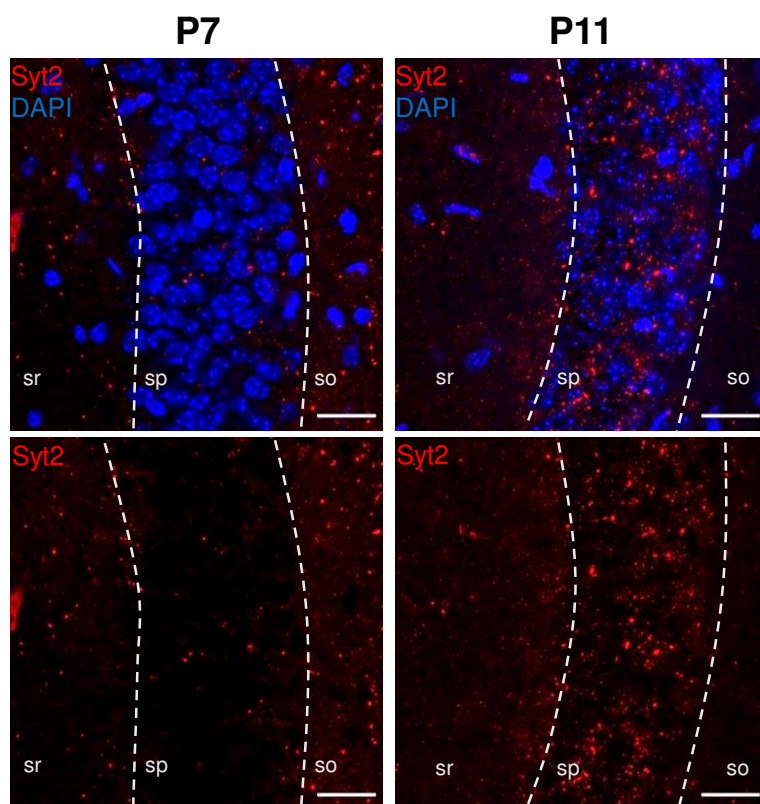
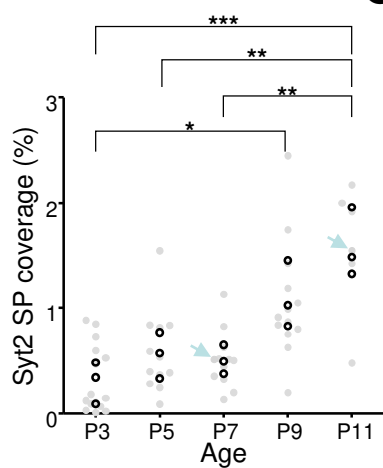


Figure 4

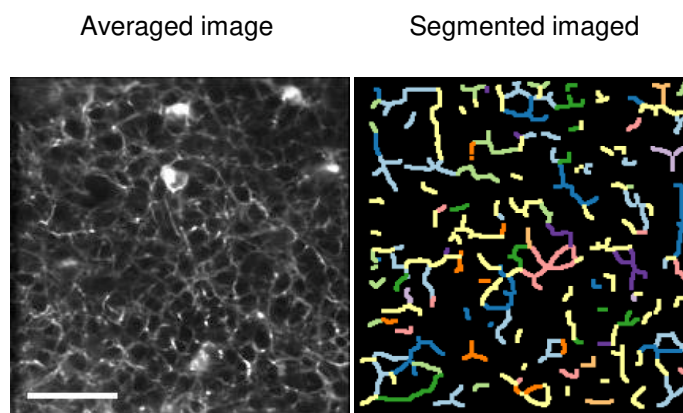
A



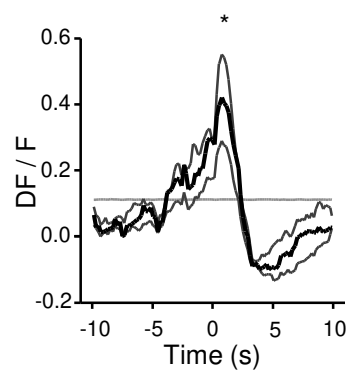
B

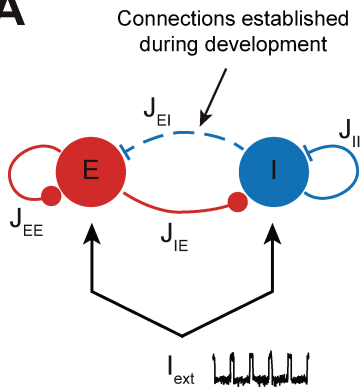
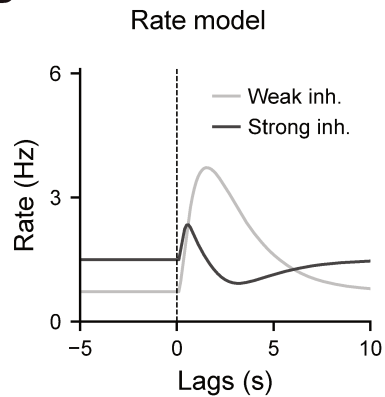


C

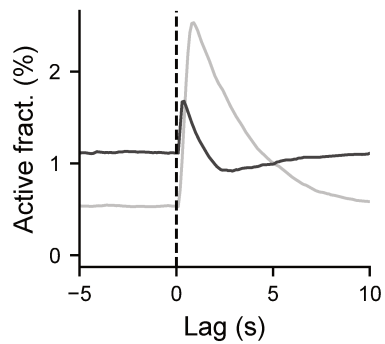


D

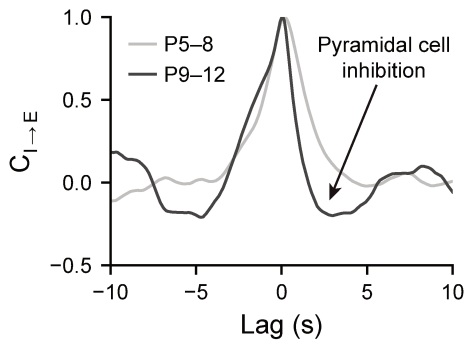


A**B**

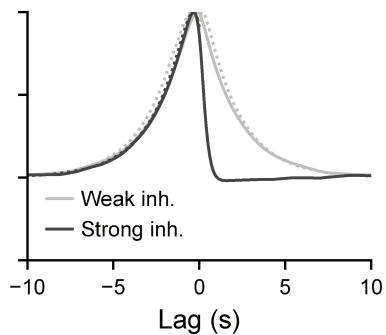
LIF model

**C**

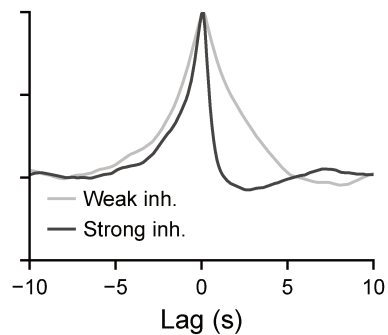
Experimental data



Rate model



LIF model



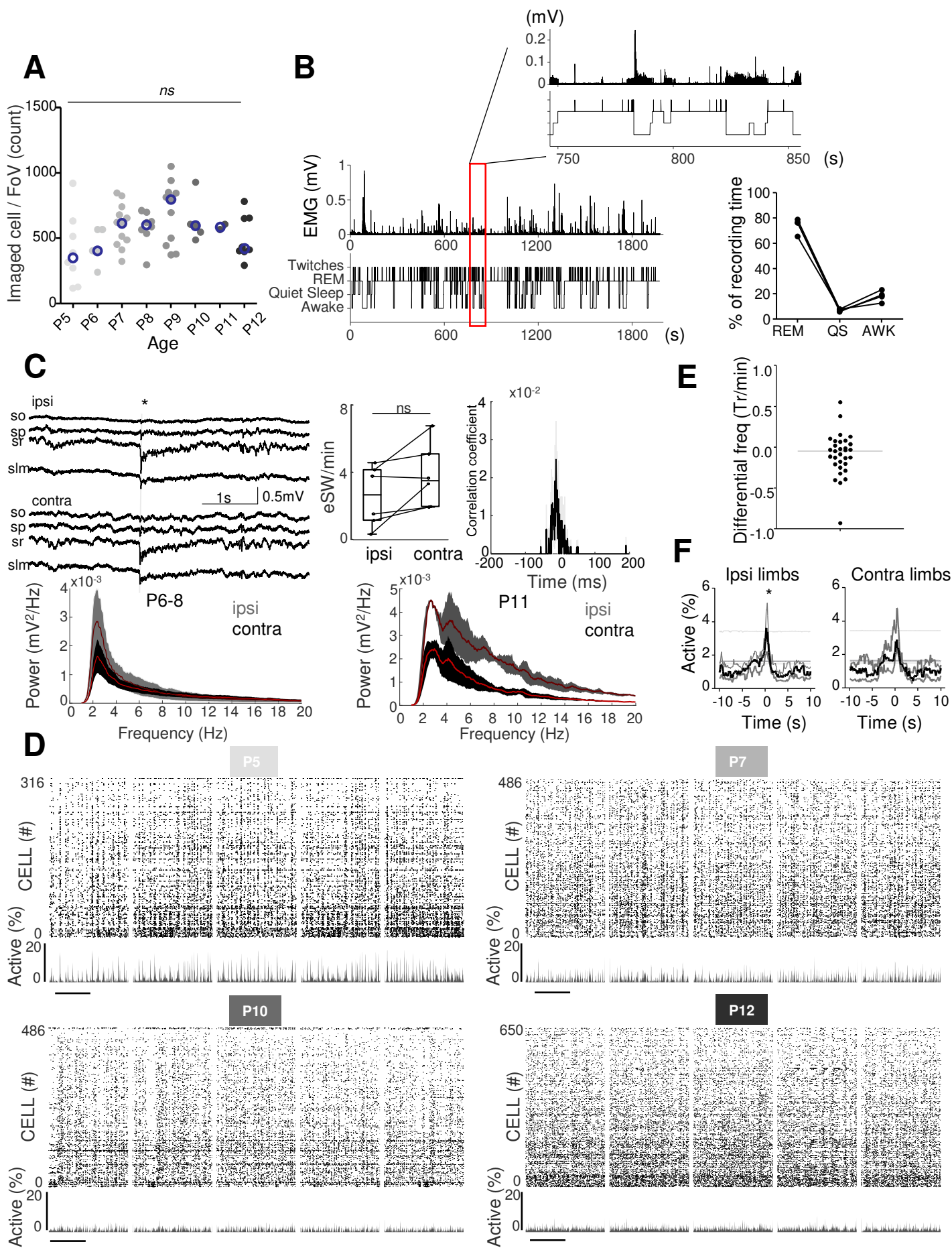
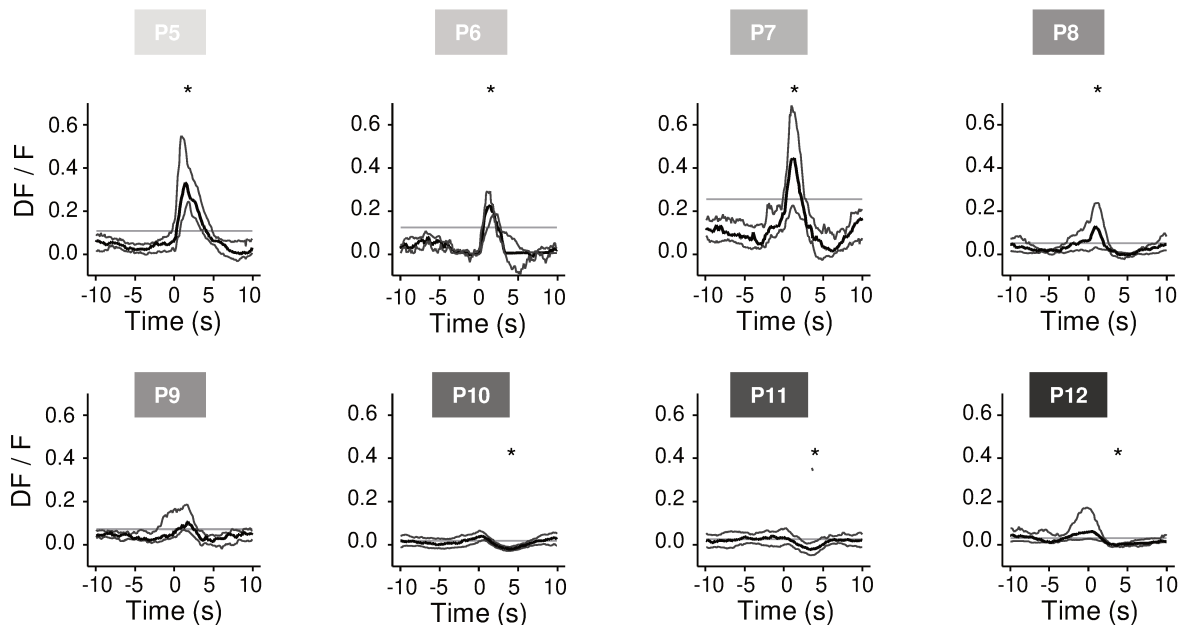
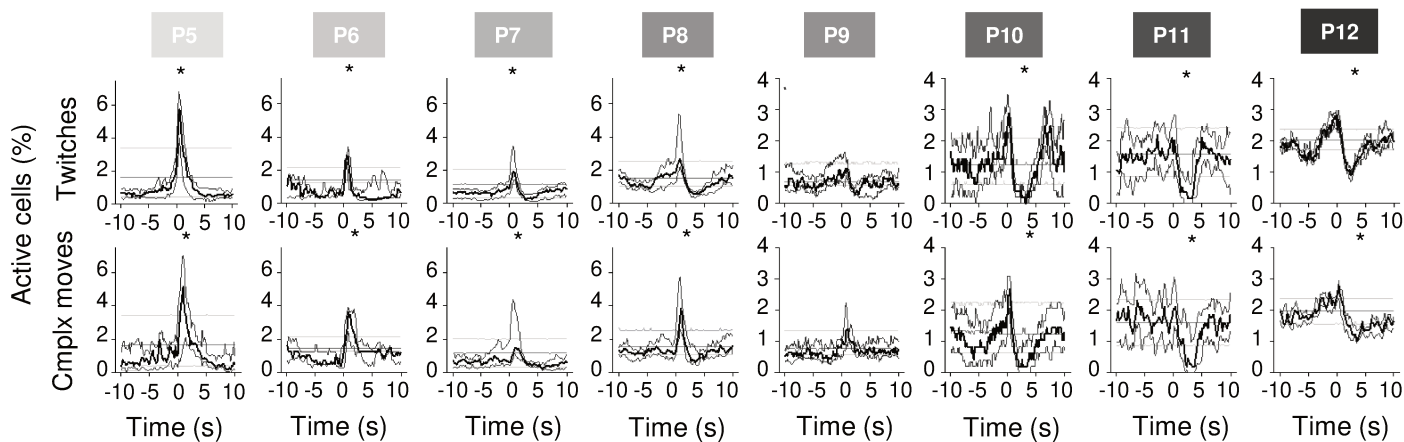


Figure 2 – figure supplement 1

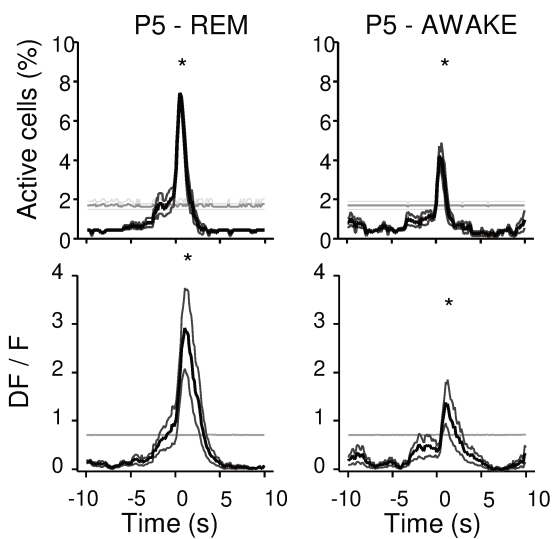
A



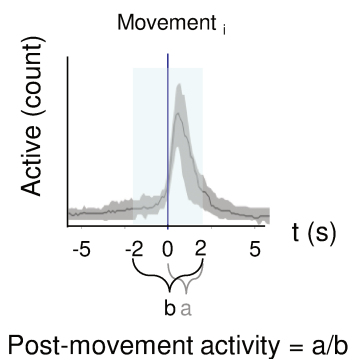
B



C



D



E

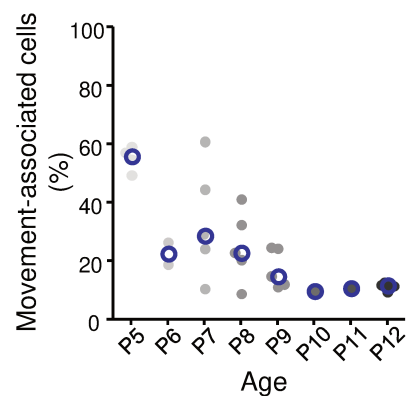


Figure 3 – figure supplement 1

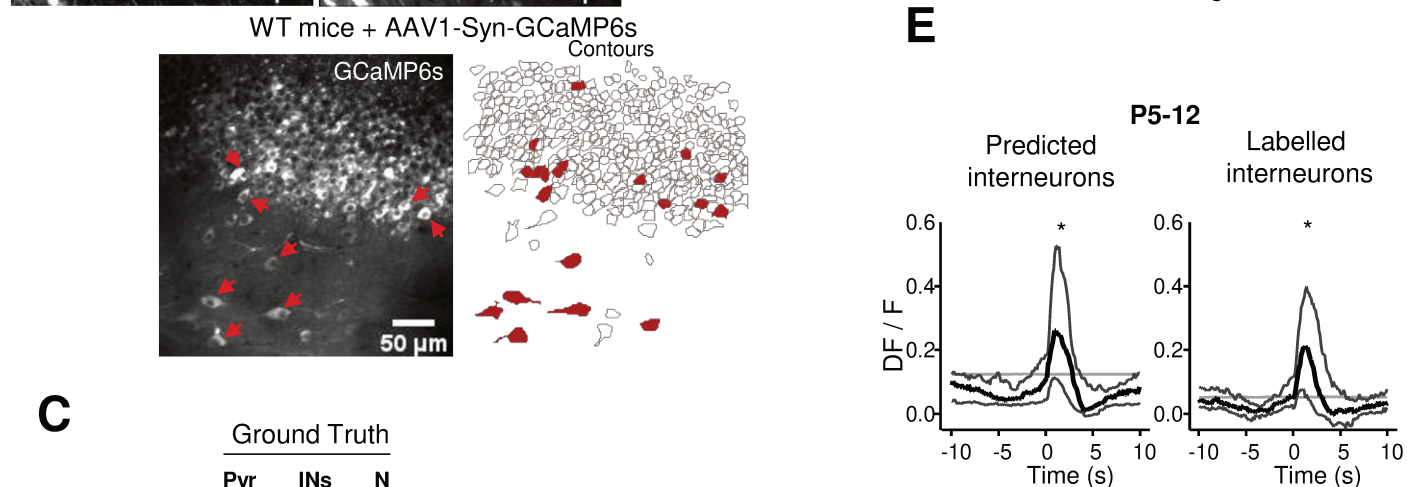
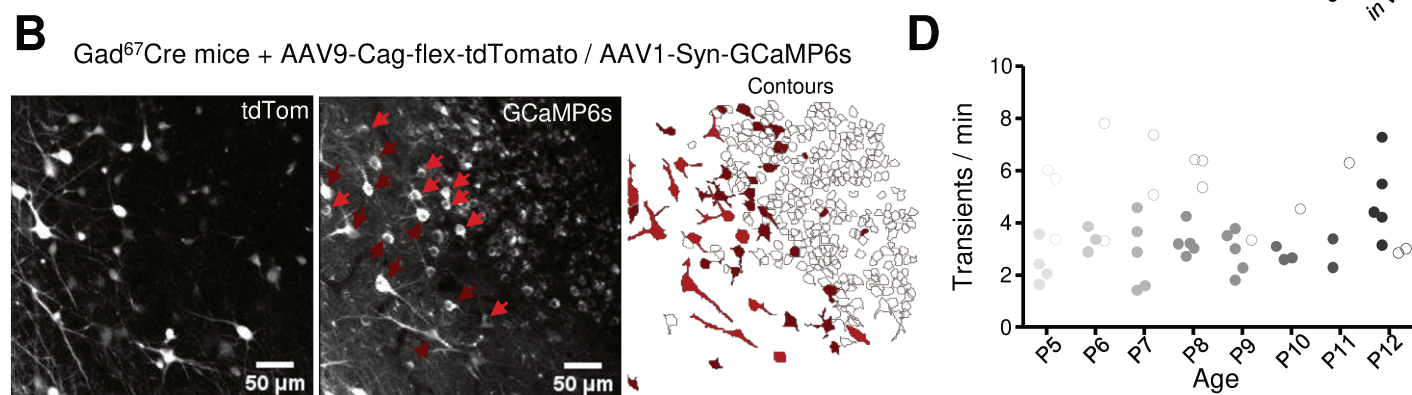
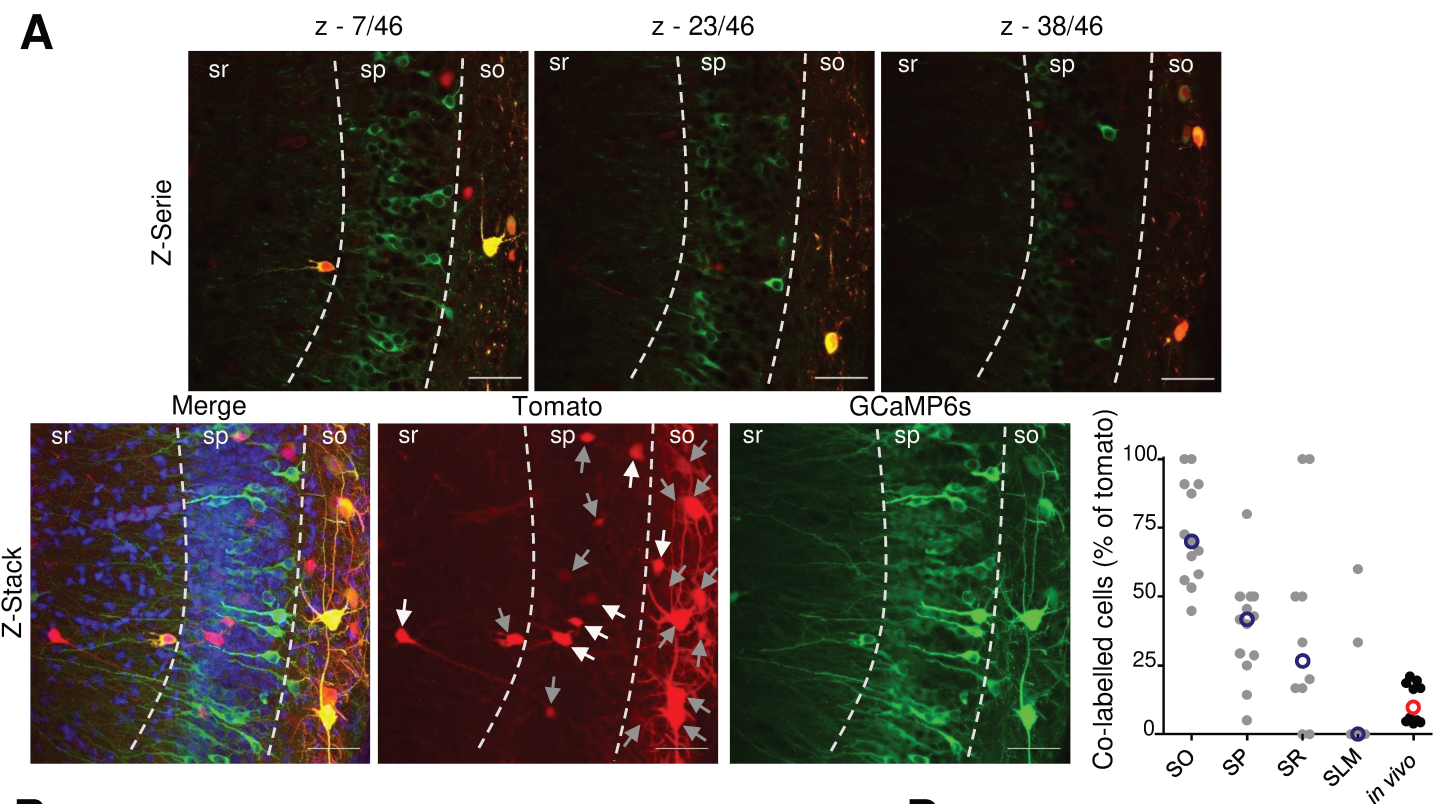


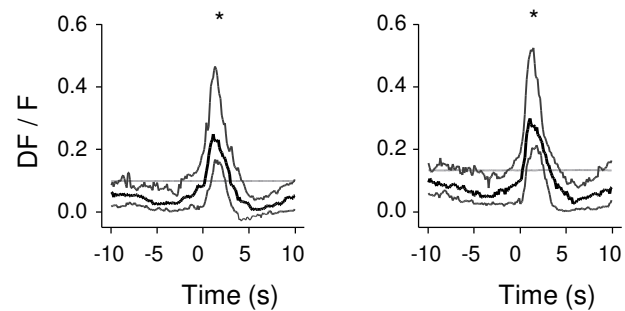
Figure 3 – figure supplement 2

A

P5-8

Pyramidal cells

Interneurons



B

P10-12

Pyramidal cells

Interneurons

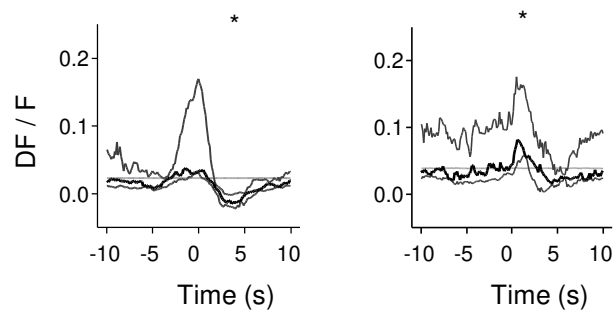
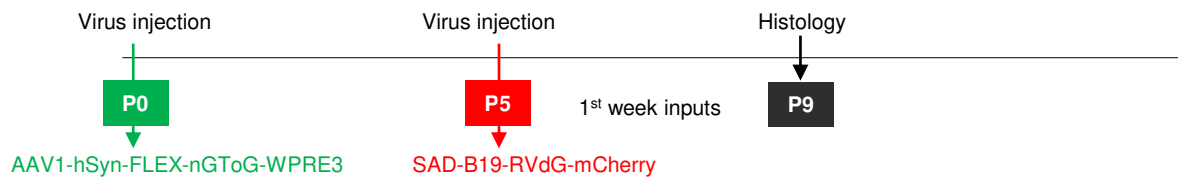


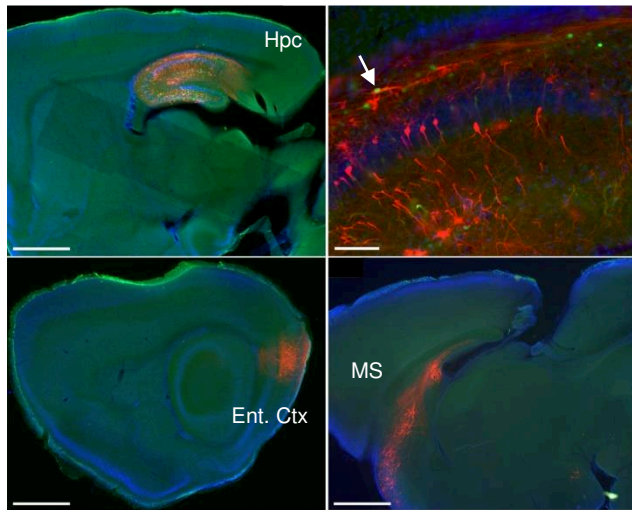
Figure 3 – figure supplement 3

A



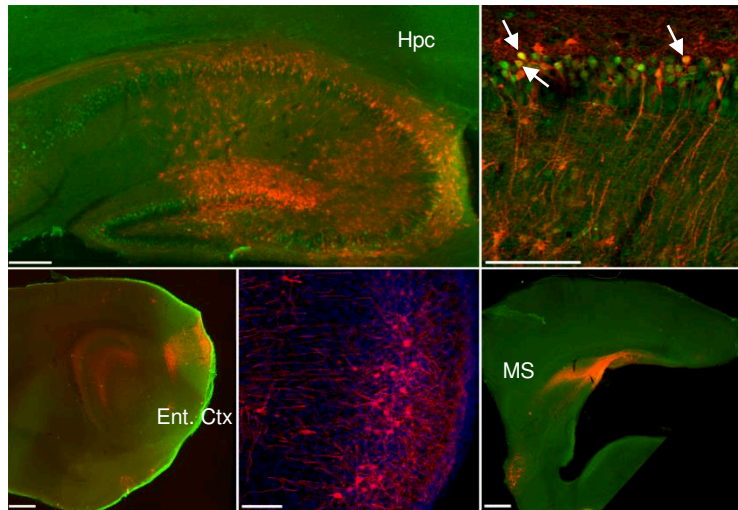
B

Gad67-Cre

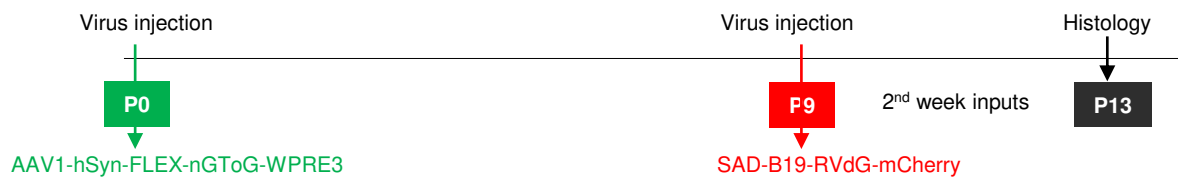


C

Emx1-Cre

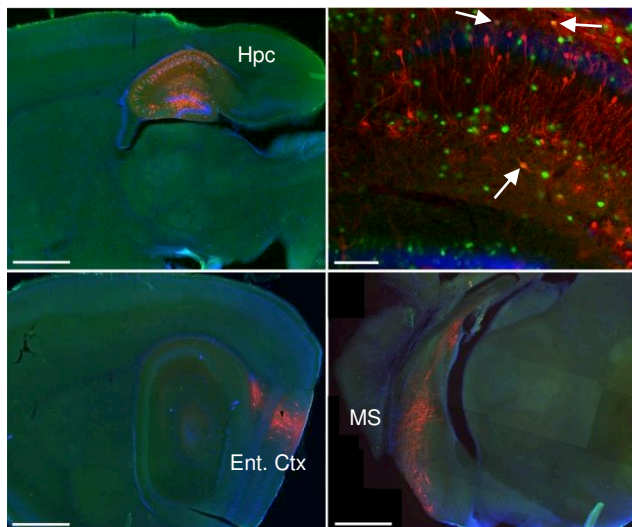


D



E

Gad67-Cre



F

Emx1-Cre

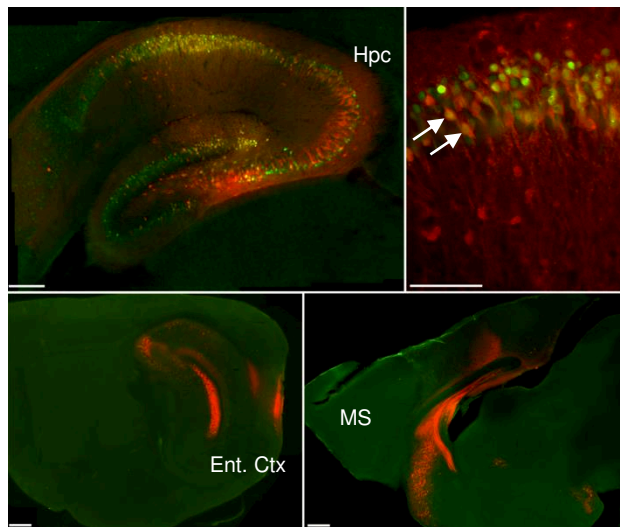
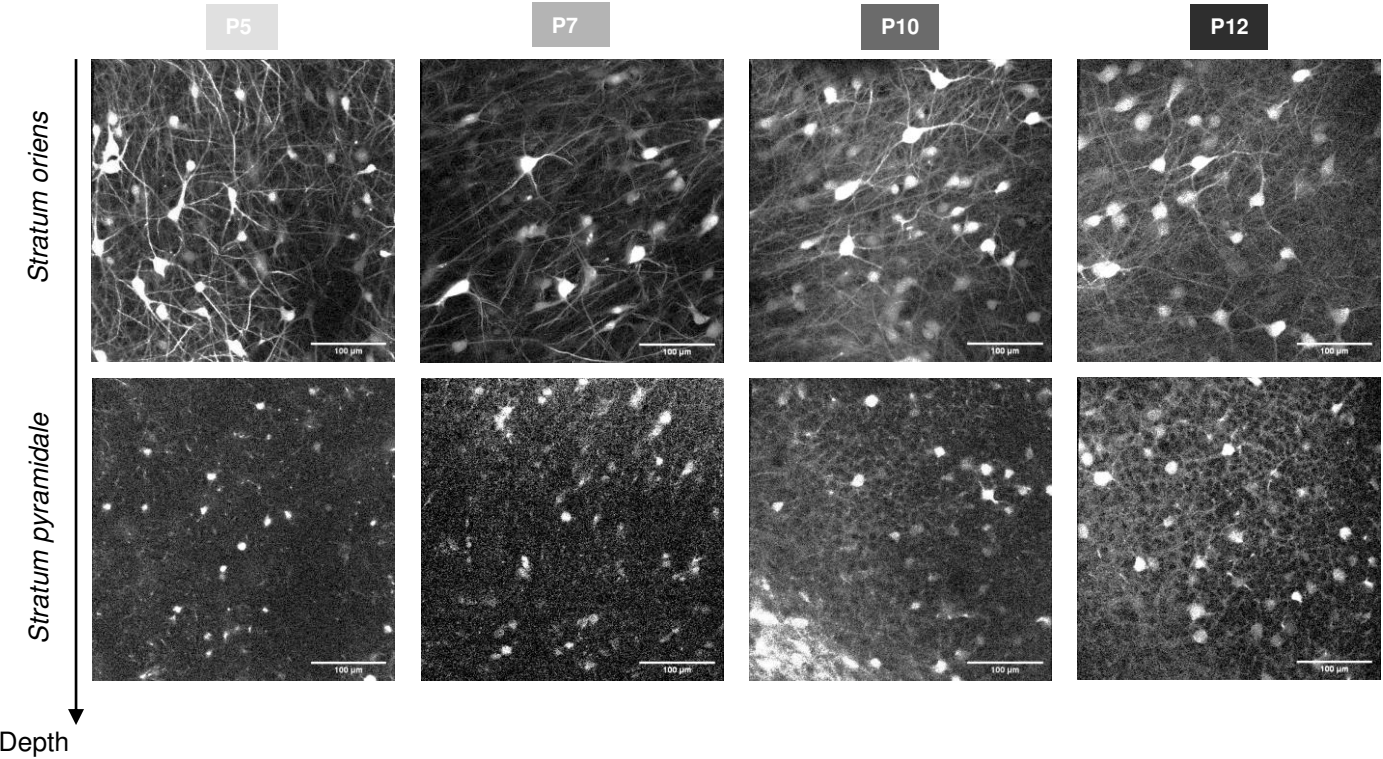
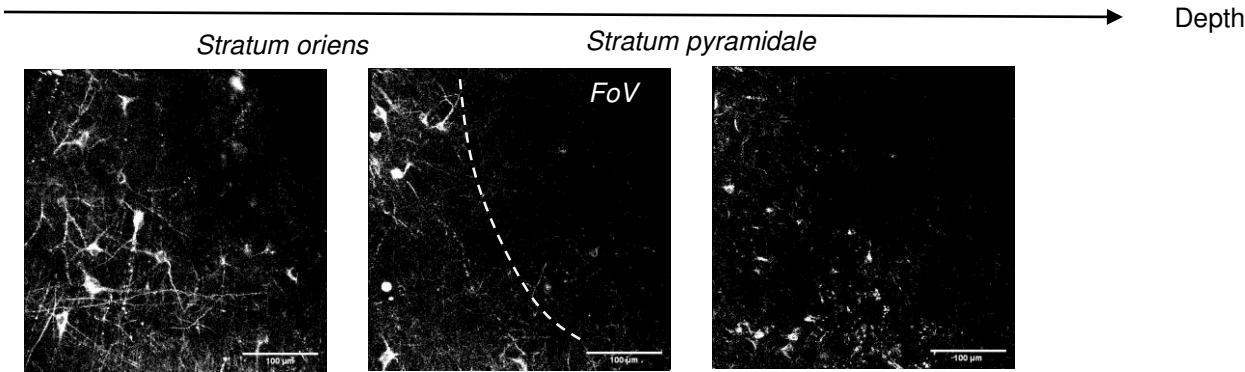


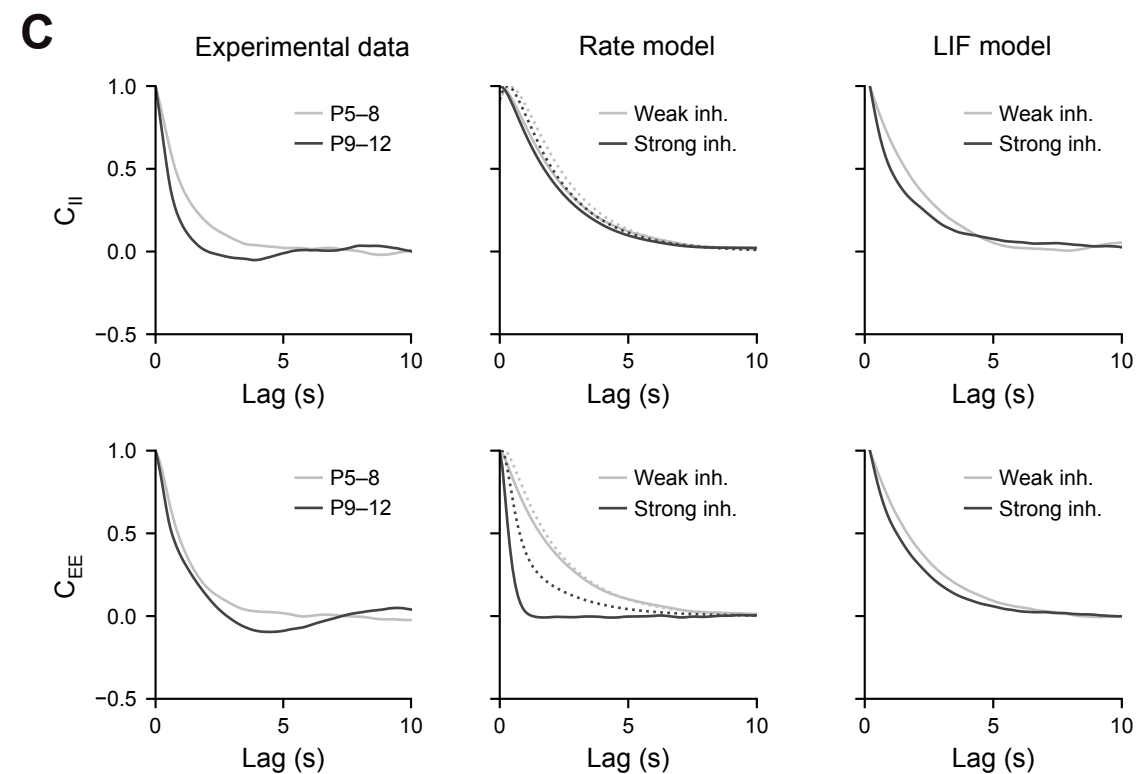
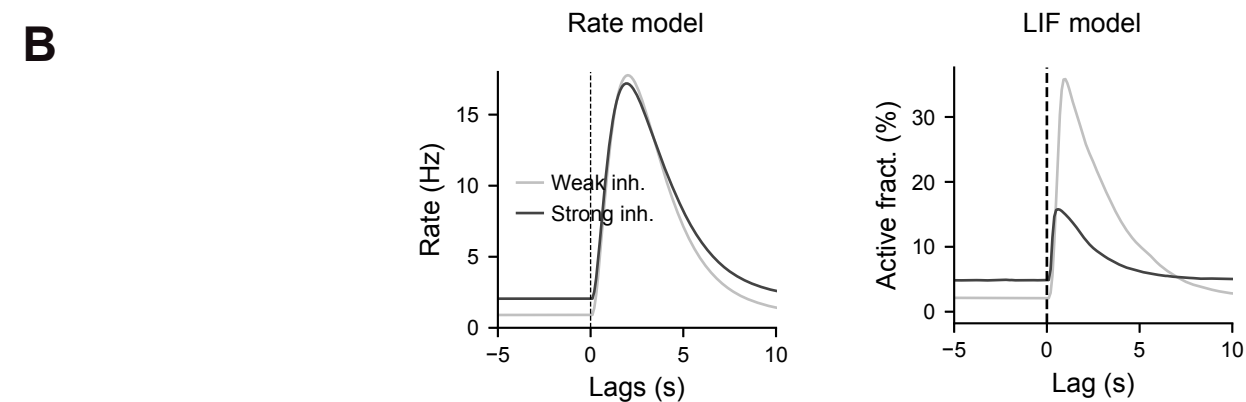
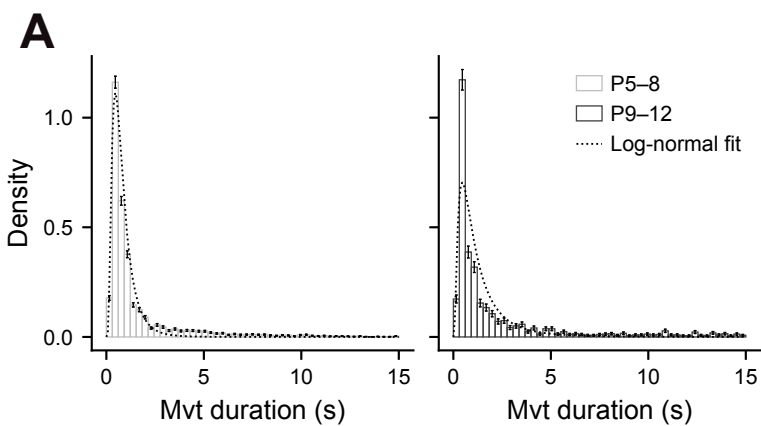
Figure 4 – figure supplement 1

A



B





1.3 Article expérimental : Leprince E, Dard R.F. et al

Titre: “Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits”

Auteurs : Erwan Leprince[‡], Robin F. Dard[‡], Salomé Mortet, Caroline Filippi¹ Marie Giorgi-Kurz, Pierre-Pascal Lenck-Santini, Michel A. Picardo, Marco Bocchio², Agnès Baude*, Rosa Cossart*

Publication : BioRxiv. (2022).

A- Résumé:

Cette étude porte sur le rôle des afférences du thalamus ventro-médian et du cortex entorhinal sur la maturation de l'activité dans la région CA1 de l'hippocampe lors de la première semaine de vie post natale chez la souris. En combinant, *in vitro*, enregistrements électrophysiologiques, imagerie calcique et photo-stimulation cette étude démontre l'existence de connexions directes du thalamus ventro-médian et du cortex entorhinal vers l'hippocampe. Cette approche *in vitro* permet de décrire la connectivité entre ces régions au niveau cellulaire. Elle montre notamment que les entrées activatrices du cortex entorhinal sont intégrées de façon directe par les cellules pyramidales et interneurons du *stratum lacunosum moleculare*, et que les entrées activatrices du thalamus ventro-médian sont intégrées de façon directe par les interneurons du *stratum lacunosum moleculare* avec une répercussion sur les cellules de la couche pyramidale. Une fois la connexion entre ces deux régions et l'hippocampe clairement établie ainsi que les circuits la supportant décrits à l'échelle cellulaire, se pose la question de savoir si ces régions contribuent à l'activité du réseau de neurones de l'hippocampe. Pour répondre à cette question une approche *in vivo* a été développée. Dans un premier temps cette étude démontre, grâce à de l'imagerie calcique, que les entrées activatrices du thalamus ventro-médian et du cortex entorhinal dans le *stratum lacunosum moleculare* de la région de CA1 de l'hippocampe sont en effet actives de façon spontanée chez le souriceau éveillé. En conclusion, ces entrées activatrices peuvent donc contribuer à l'activité de la région CA1 de l'hippocampe. Dans un second temps cette étude teste, toujours grâce à l'imagerie calcique, l'effet d'une inhibition temporaire du thalamus ventro-médian ou du cortex entorhinal sur l'activité des cellules du *stratum pyramidale*. En décrivant l'impact sur la dynamique du réseau de CA1 chez le souriceau non anesthésié de l'inhibition de l'une ou de l'autre de ces régions cette étude établie la contribution du thalamus ventro-médian et du cortex entorhinal dans la dynamique du réseau de neurones de la région CA1 lors de la première semaine de vie chez la souris. Dans son ensemble cette étude permet donc de décrire les circuits cellulaires supportant les connexions du thalamus ventro-médian et du cortex entorhinal vers l'hippocampe ainsi que leur contribution respective à la dynamique du réseau hippocampique lors du développement précoce chez la souris.

B- Contributions :

Au cours de ma thèse j'ai pu contribuer à cette étude à plusieurs niveaux. Ainsi j'ai été amené à développer en partie les scripts (sous Matlab) nécessaire à l'analyse des données d'imagerie calcique *in vitro*, à réaliser les chirurgies permettant l'imagerie calcique *in vivo* des afférences thalamiques et entorhinales dans le *stratum lacunosum moleculare* et permettant l'imagerie calcique *in vivo* de la couche pyramidale lors de l'inhibition du thalamus ou du cortex entorhinal. Enfin j'ai été amené à développer et à adapter la librairie d'analyses de CICADA aux besoins spécifiques de cette étude.

C- Article :

<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2022/06/04/2022.06.03.494656.full.pdf>

Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits

Erwan Leprince^{1,*}, Robin F. Dard^{1,*}, Salomé Mortet¹, Caroline Filippi¹, Marie Giorgi-Kurz¹, Pierre-Pascal Lenck-Santini¹, Michel A. Picardo¹, Marco Bocchio^{1,2}, Agnès Baude^{1,†}, Rosa Cossart^{1,†}

¹ Aix Marseille Univ, INSERM, INMED (UMR1249), Turing Centre for Living systems, Marseille, France

² Department of Psychology, Durham University, Durham, UK

[†] Co-last authors

^{*} Co-first authors

correspondence: rosa.cossart@inserm.fr

SUMMARY

The adult CA1 region of the hippocampus produces coordinated neuronal dynamics with minimal reliance on its extrinsic inputs. In contrast, the neonatal CA1 is tightly linked to externally-generated sensorimotor activity but the circuit mechanisms underlying early synchronous activity in CA1 remain unclear. Here, using a combination of *in vivo* and *ex vivo* circuit mapping, calcium imaging and electrophysiological recordings in mouse pups, we show that early dynamics in the ventro-intermediate CA1 are under the mixed influence of entorhinal (EC) and thalamic (VMT) inputs. Both VMT and EC can drive internally-generated synchronous events *ex vivo*. However, movement-related population bursts detected *in vivo* are exclusively driven by the EC. These differential effects on synchrony reflect the different intrahippocampal targets of these inputs. Hence, cortical and subcortical pathways act differently on the neonatal CA1, implying distinct contributions to the development of the hippocampal microcircuit and related cognitive maps.

INTRODUCTION

Cortical neurons are spontaneously active in a coordinated manner as they mature and integrate into functional networks (Blankenship and Feller, 2009; Cossart and Garel, 2022; Martini et al., 2021; Molnár et al., 2020). Spontaneous activity contributes to the progressive tuning of cells and circuits to function by adjusting initial genetic programs to the statistics of the environment and the body (Cossart and Garel, 2022). Given this major developmental role of early spontaneous neuronal activity, it is essential to understand the circuit mechanisms supporting its generation. These involve the interaction between local intracortical circuits and extrinsic inputs. This interaction between local and external drives can be reflected in the co-existence of different types of network patterns supported by separate circuits (Allene et al., 2008; Siegel et al., 2012).

While the local and peripheral circuits involved in the generation of early spontaneous activity start to be well-elucidated in the developing sensory neocortex (Luhmann and Khazipov, 2017; Martini et al., 2021; Molnár et al., 2020), this is not yet the case for the hippocampus (Cossart and Khazipov, 2021). This stems from the combined difficulty to experimentally access this region with optical approaches allowing for local circuit dynamics mapping at cellular resolution, and to integrate the various external inputs it receives into a comprehensive framework. Within the hippocampus, the CA1 region is under the conjunctive influence of many extra-hippocampal brain regions, including the medial and lateral entorhinal cortices (EC) conveying spatial and non-spatial (e.g. sensory) information, as well as the nucleus reuniens from the higher order ventral midline thalamus (VMT), conveying information from the prefrontal cortex (Cassel et al., 2021; Ferraris et al., 2021; Vertes, 2015). *Ex vivo* early CA1 dynamics are dominated by so-called Giant Depolarizing Potentials (Ben-Ari et al., 1989), largely relying on local GABAergic circuits for their generation (Bocchio et al., 2020; Wester and McBain, 2016). *In vivo*, early CA1 dynamics have been mainly described with extracellular electrophysiological recordings. They are dominated by early sharp waves (eSPWs), recently described as bottom-up events involving activation of the EC during myoclonic movements and a major sink in the *stratum lacunosum moleculare* (*slm*) indicating this CA1 sublayer as a significant site of excitation (Valeeva et al., 2019). In addition to interactions within the hippocampal formation, the link between movements and eSPWs may also involve subcortical pathways such as projections from the nucleus reuniens from the ventral midline thalamus directly to CA1, given that these: (i) like the EC, also provide a source of glutamatergic excitation terminating onto the *slm*, (ii) develop prior to intrahippocampal circuits, (iii) have a mild, but significant functional impact on the occurrence of hippocampal

theta bursts (Hartung et al., 2016), and convey important top-down information from the prefrontal cortex.

Here we have used a combination of *ex vivo* and *in vivo* circuit mapping with calcium imaging, optogenetics and chemogenetics to disentangle the respective contributions of EC and VMT inputs to the coordination of local CA1 dynamics at the end of the first postnatal week in mice. We show that both inputs can significantly modulate early CA1 dynamics recorded *ex vivo* and *in vivo* but differ in their distribution and preferred postsynaptic targets. While the EC most often directly triggers CA1 synchronization through large amplitude EPSCs onto CA1 pyramids, VMT inputs rather exert a modulatory indirect effect onto these cells. Still, the VMT can synchronize activity *ex vivo* through the almost exclusive activation of CA1 *s/m* interneurons.

MATERIALS AND METHODS

MICE

All experiments were performed under the guidelines of the French National Ethics Committee for Sciences and Health report on "Ethical Principles for Animal Experimentation" in agreement with the European Community Directive 86/609/EEC (Apafis #18-185 and #30-959). We used wild-type SWISS mouse pups (C.E Janvier, France) for *ex vivo* experiments. For the *in vivo* experiments, we used mouse pups from the breeding of VGluT2-Cre (a gift from M. Esclapez; (Vong et al., 2011) or Emx1-Cre (a gift from A. de Chevigny; (Gorski et al., 2002) mice with 7- to 8-weeks-old wild-type SWISS females (C.E Janvier, France). All efforts were made to minimize both the suffering and the number of animals used.

EXPERIMENTAL PROCEDURES AND DATA ACQUISITION

Viruses. Anterograde tracing experiments and excitatory opsin expression (Chronos) were achieved using AAV8-Syn-Chronos-tdTomato-WPRE-bGH (pAAV-Syn-Chronos-tdTomato was a gift from Edward Boyden (Addgene viral prep # 62726-AAV8 ; <http://n2t.net/addgene:62726> ; RRID:Addgene_62726, (Klapoetke et al., 2014). Inhibitory DREADD expression was induced in a Cre-dependent manner using AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry was a gift from Bryan Roth (Addgene viral prep # 44362-AAV9; <http://n2t.net/addgene:44362>; RRID:Addgene_44362, (Krashes et al., 2011). Fluorescent protein mCherry expression was induced in a Cre-dependent manner using AAV5-hSyn-DIO-mCherry (pAAV-hSyn-DIO-mCherry was a gift from Bryan Roth (Addgene viral prep # 50459-AAV5 ; <http://n2t.net/addgene:50459> ;

RRID:Addgene_50459). *In vivo* calcium imaging experiments were performed using AAV1-hSyn-GCaMP6s.WPRE.SV40 (pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 was a gift from Douglas Kim & GENIE Project (Addgene viral prep #100843-AAV1; <http://n2t.net/addgene:100843>; RRID:Addgene_100843, (Chen et al., 2013), AAV9-hSyn-FLEX-axonGCaMP6s (pAAV-hSynapsin1-axon-GCaMP6s was a gift from Lin Tian (Addgene viral prep # 112010-AAV9 ; <http://n2t.net/addgene:112010> ; RRID:Addgene_112010, (Broussard et al., 2018) and AAV1-CAG-tdTomato (pAAV-FLEX-tdTomato was a gift from Edward Boyden (Addgene viral prep # 59462-AAV1 ; <http://n2t.net/addgene:59462> ; RRID:Addgene_59462)).

Virus injections. For P0 stereotaxic virus injections (AAV8-Syn-Chronos-tdTomato-WPRE-bGH, AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry, AAV5-hSyn-DIO-mCherry or AAV9-hSyn-FLEX-axonGCaMP6s) mouse pups were anesthetized by inducing hypothermia on ice and maintained on a dry ice-cooled stereotaxic adaptor (Stoelting, 51615) fixed to a stereotaxic frame with a digital display console (Kopf, Model 940). Under aseptic conditions, an incision was made in the scalp and the skull was exposed and gently drilled (Ball Mill, Carbide, #1/4 .019", 0.500 mm diameter, CircuitMedic). The ventral midline thalamus (VMT), the entorhinal cortex (EC) and the dorsal hippocampus (dHPC) were targeted by empirically determined coordinates, based on the Atlas of the Developing Mouse Brain (Paxinos et al., 2020). Using the transverse sinus and the superior sagittal sinus as references, VMT coordinates were 1.15 mm anterior from the sinus intersection; 0.1 mm lateral from the sagittal sinus; 2.5 mm depth from the brain surface. The EC injection site was ~0.62 mm posterior from the sinus intersection; ~2.73 mm lateral from the sagittal sinus; at 2 mm depth from the brain surface. Finally, dHPC coordinates were 0.8 mm anterior from the sinus intersection; 1.5 mm lateral from the sagittal sinus; 1.1 mm depth from the brain surface. Ten or twenty nL of undiluted viral solution were delivered using a glass pipette pulled from borosilicate glass (3.5" 3-000-203-G/X, Drummond Scientific) and connected to a Nanoject III system (Drummond Scientific). The tip of the pipette was broken to achieve an opening with an internal diameter of 30-40 μ m. We injected 10 or 20 nL of AAV8-Syn-Chronos-tdTomato-WPRE-bGH in the VMT or the EC of SWISS mouse pups. Emx1-Cre mouse pups were injected in the EC or the dHPC with 10 nL AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry. VGluT2-Cre mouse pups were injected in the VMT with 10 nL of either AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry or AAV9-hSyn-FLEX-axonGCaMP6s.

The intracerebroventricular injection protocol was adapted from published methods (Kim et al., 2014); (Dard et al., 2022). Briefly, mouse pups were anesthetized by hypothermia. Emx1-Cre mouse pups were injected in the left lateral ventricle with 2 μ L of a mixture of AAV2.1-hSynGCAMP6s.WPRE.SV40 and Fast Blue dye (1:20). VGluT2-Cre mouse pups were similarly injected with either the AAV2.1-hSynGCAMP6s.WPRE.SV40/Fast Blue dye

mixture or a AAV1-CAG-tdTomato/Fast Blue dye (1:20) mixture. To reach the ventricle, we injected in a position that was roughly two fifths of an imaginary line drawn between lambda and the left eye at a depth of 0.4 mm. Correct injection was verified by the spreading of the blue dye.

At least five days were allowed for virus expression before recording procedures.

Drugs. Solutions of SR95531 hydrobromide (Tocris, catalogue no. 1262/10) and NBQX disodium salt (Tocris, catalogue no. 1044/10) were made to final concentrations of 10 μ M and 20 μ M, respectively.

Clozapine N-oxide solution (CNO) was prepared at a final concentration of 1 mg/mL. Briefly, CNO (Tocris, Ref# 4936, 10mg) was dissolved in 5% DMSO and then diluted with saline solution (DPBS, 14190-144, Life Technologies) to reach 1 mg/mL CNO and 0.25% DMSO. Animals were injected once, before *in vivo* recordings, with 10 μ L/g of this solution to reach the final dose of 10 mg/kg.

Slice Preparation for ex vivo experiments. Horizontal hippocampal slices (400 μ m thick) were obtained from 5 to 7-postnatal days old (P5–P7) Chronos-injected and non-injected (control) SWISS pups. Brains were sliced with a Leica VT1200 S vibratome in ice-cold oxygenated modified artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 7 MgCl_2 , 5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 5 D-glucose, 126 CholineCl. Slices were left for one hour at room temperature in oxygenated ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.3 MgCl_2 , 2.0 CaCl_2 , and 10 D-glucose.

Ex vivo 2-photon calcium imaging and optogenetics. *Ex vivo* 2-photon calcium imaging experiments were performed on injected and non-injected (control) SWISS pups' slices using the calcium indicator Fura2-AM (Molecular Probes, F1221). Slices were incubated in the dark at 35–37 °C for 30 min within a small petri dish containing 2.5 mL of oxygenated ACSF with 25 μ L of a 1 mM Fura2-AM solution (in 96 % DMSO, 4 % pluronic acid). One hour later, slices were transferred to a recording chamber continuously perfused with oxygenated ACSF (3 mL/min) at 35–37°C. Calcium imaging was performed with a multibeam multiphoton pulsed laser scanning system (LaVision Biotech) coupled to a microscope as previously described (Crépel et al., 2007). Images were acquired through a CCD camera, which typically resulted in a time resolution of 124 ms per frame. Slices were imaged using a 20X, NA 0.95 objective (Olympus). Imaging depth was on average 80 μ m below the surface (range: 50–100 μ m).

Optogenetics stimulation was performed by sending a TTL signal generated with Clampex software and a 1440A Digidata (Molecular Devices) to a 488 μ m OBIS laser (Coherent). The light pulses were delivered through an optic fiber placed above the CA1

stratum lacunosum moleculare (slm). Imaging acquisition was divided in 3 equal parts: (1) a baseline period with no light stimulation during which we recorded spontaneous activity of the CA1 region; (2) a stimulation period; (3) a recovery period with no light stimulation. The stimulation protocol consisted of the application of bursts of 3 light pulses (3 ms per light pulse) at 20 Hz. Bursts were repeated at 0.1 or 0.2 Hz.

Patch clamp recordings and optogenetics in injected SWISS pups. Patch clamp recordings in injected SWISS pups' slices were performed using a SliceScope Pro 1000 rig (Scientifica) equipped with a CCD camera (Hamamatsu Orca-05G). Slices were transferred to a recording chamber and continuously perfused with oxygenated ACSF (3 mL/min) at ~35°C. Patch recording electrodes (4-8 MΩ resistance) were pulled using a PC-10 puller (Narishige) from borosilicate glass capillaries (GC150F-10, Harvard Apparatus) and filled with a filtered voltage clamp intracellular solution containing (in mM): 130 Cs-gluconate, 10 CsCl, 0.1 CaCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP (pH 7.3 and ~280 mOsm), and 0.5 % biocytin. Electrophysiological signals were amplified (Multiclamp 700B), low-pass filtered at 2.9 kHz, digitized at 5-20 kHz and acquired using a Digidata 1440A digitizer and pClamp 10 software (all from Molecular Devices).

An optoLED system (Cairn Research) consisting of two 3.5 WLEDs was used. The 470 nm WLED coupled to a GFP filter cube was employed to stimulate Chronos expressing axons (3 ms-long light pulses). The white WLED coupled to an RFP filter cube was used to visualize the Chronos/tdTomato-expressing axons. Light was delivered using a 40× objective, leading to a light spot size of ~1 mm, which was able to illuminate the whole hippocampus.

Visually guided patch clamp recordings, in whole-cell configuration, were made from randomly sampled CA1 *slm* putative GABAergic interneurons (*slmINs*) and random CA1 pyramidal cells (PC) in the *stratum pyramidale*. Cell type identity was confirmed *post-hoc* based on morphological features (mainly the shape and location of the dendrites and axons, presence or absence of dendritic spines). To determine the nature of the VMT and EC inputs, one suprathreshold light pulse (0.5 – 1 mW/mm² for *slmINs*, 4 – 8 mW/mm² for PC) was applied to cells clamped at -75 mV and at 0 mV, the reversal potential for GABAergic and glutamatergic transmission, respectively. Since some of the *slmINs* showed monosynaptic GABAergic responses to stimulation of EC afferents, all the recording protocols for *slmINs* with EC stimulation were performed in the presence of the GABA_A receptor blocker SR 95531 hydrobromide. To measure the postsynaptic current amplitude and paired pulse ratio on *slmINs*, two pulses of light separated by 50 ms were applied on cells voltage-clamped at -75 mV. To confirm the contribution of an AMPA-R component to the monosynaptic responses at -75 mV, suprathreshold light pulses were applied in the presence of NBQX disodium salt (Tocris, catalogue no. 1044/10). For NMDA/AMPA ratio (N/A ratio) on *slmINs*, the previous

stimulation protocol was repeated on the same cell voltage-clamped at +40 mV in the presence of the NBQX disodium salt. To measure the postsynaptic current amplitude of CA1 PCs, one suprathreshold light pulse was applied on cells voltage-clamped at -75 mV. To quantify the polysynaptic responses of CA1 PCs during the stimulation of VMT inputs, recordings were divided in three periods: (1) a baseline period during which we recorded spontaneous postsynaptic currents; (2) a stimulation period; (3) a recovery period with no light stimulation. The one second time period following the first light pulse of the stimulation train (10 pulses total at 20Hz) was considered as the stimulation period. PCs were clamped at -75 mV and at 0 mV. Then, polysynaptic responses on PCs were recorded at -75 mV in the presence of the GABA_A receptor blocker, SR 95531 hydrobromide, during the light stimulation protocol of VMT afferents. For all protocols, sweeps were separated by a 20 s delay period to avoid the induction of plasticity and ensure stable responses.

Surgery for CA1 in vivo extracellular electrophysiological recordings. Surgery was performed in mice aged between P5 and P8 under isoflurane anesthesia (2-4%). Before surgery, mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (0,03mg/kg) and topical administration of lidocaine/prilocaine ointment (5%) on the scalp. During anesthesia, the scalp was removed and the skull cleaned. Two silver chloride wires, serving as ground and reference, were de-insulated at the tip for 1mm, placed between the skull and the dura above the posterior part of the auditory cortex, secured with cyanoacrylate glue (vetbond, 3M) and later fixed with dental cement. A 3 by 1 cm head bar was then fixed above the cerebellum and posterior visual cortex with dental cement, letting the areas above both hippocampi accessible. Craniotomies were then performed at the following coordinates with regards to Bregma: AP = 1,3 mm and ML=1,5 mm between P5 and P6 or AP= 1,5 mm and ML= 1,7 mm between P7 and P8. The dura at the craniotomy sites was then covered with surgical silicone adhesive (kwik-cast) for protection until recording time. Pups were then let to recover without anesthesia on a heating pad.

Thirty minutes after surgery, pups were secured to the recording apparatus by fixing the head bar to the set-up. The rest of the body rested on a heating pad to maintain body temperature at 37°C. CNO at a dose of 10 mg/kg was then injected subcutaneously. Throughout this period and the following experiment, pups were constantly monitored and fed with veterinary milk *ad libitum*.

CA1 in vivo extracellular electrophysiological recordings. Before the recordings, the silicone adhesive was removed from the craniotomy and a 32-channel silicon probe (Buzsaki32, Neuronexus), coated with a red fluorescent marker (DiI, Sigma) was lowered in the dorsal CA1 until it reached the pyramidal layer (~1200 µm depth). The electrophysiological

signal from the electrodes was digitized and sampled at 30KHz, filtered (0.1 Hz- 6000 Hz) and multiplexed by a preamplifier (RHD-32 channel, Intan Technologies). It was then recorded synchronously with the analog signal from the Piezzo-electric sensors via an acquisition system (RHD2000_evaluation_system, Intan Technologies). Acquisition was controlled via the Open-Ephys (Siegle et al., 2017) graphical user interface. Recordings started 5 minutes after CNO injection and lasted for 1 hour.

Surgery for CA1 in vivo 2-photon imaging. The surgery to implant a 3-mm-large cranial window above corpus callosum was performed as already described (Dard et al., 2022) and adapted from previous methods. Briefly, P6-P8 mice were anesthetized and maintained during the whole surgery with 1-3 % isoflurane in a mix of 90% O₂-10% air. Body temperature was controlled and maintained at 36°C. Analgesia was controlled using buprenorphine (0.05 mg/kg). After fixing a small custom-made headplate, the skull was removed, and the cortex was gently aspirated until the appearance of the external capsule. At the end of the cortex resection, we sealed a 3 mm-diameter glass circular cover glass (#1 thickness, Warner Instrument) attached to a 3 mm-diameter and 1.2 mm-high cannula (Microgroup INC) using KwikSil adhesive (WPI). The edge of the cannula was fixed to the skull with cyanoacrylate. We let the animal recover on a heated pad for at least one hour before the imaging experiment. Throughout this period and the following experiment, pups were constantly monitored and fed with veterinary milk *ad libitum*.

CA1 in vivo 2-photon calcium imaging in mouse pups. Two sets of *in vivo* imaging experiments were performed: (1) calcium imaging of VMT axons in the CA1 *slm* area (VGluT2-Cre mouse pups injected with AAV9-hSyn-FLEX-axonGCaMP6s in VMT and AAV1-CAG-tdTomato in the left lateral ventricle), and (2) calcium imaging of the CA1 neurons in the *stratum pyramidale* with DREADD inhibition of VMT or EC (VGluT2-Cre or Emx1-Cre mouse pups injected with AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry, respectively, in the VMT or the EC, and AAV1-hSynGCaMP6s.WPRE.SV40 in the left lateral ventricle). Two-photon calcium imaging was performed on the day of the window implant using a single beam multiphoton pulsed laser scanning system (TriM Scope II, LaVision Biotech) coupled to a microscope as previously described (Villette et al., 2015). Images were acquired through a GaAsP PMT (H7422-40, Hamamatsu) using a 16X water immersion objective (NIKON, NA 0.8).

For calcium imaging of VMT axons in CA1 *slm* region (1), imaging fields were located 300 to 400 µm below the *stratum pyramidale*, i.e. 700 µm under the glass window. Using Inspector software (LaVision Biotech), the fluorescence signal from a 400 µm x 400 µm field of view (FOV) was acquired at approximately 2 Hz with a 6.7 µs dwell time per pixel (2

μm/pixel) or from a 300 μm x 300 μm FOV at approximately 1 Hz with a 0.4 μs dwell time per pixel (0.29 μm/pixel)

For DREADD experiments (2), FOVs were selected to sample the intermediate CA1 area and maximize the number of imaged neurons in the *stratum pyramidale*. FOVs of 400 μm x 400 μm were acquired at approximately 8 Hz with a 1.8 μs dwell time per pixel (2 μm/pixel). Ten-minute imaging blocks were performed for one hour following the subcutaneous injection of CNO, at a dose of 10 mg/kg, or saline solution (DPBS, 14190-144, Life Technologies).

Simultaneously with imaging experiments, mouse pup motor behavior was monitored using two infrared cameras (Basler, acA1920-155um) positioned on each side of the animal. For each camera, a square signal corresponding to the exposure time of each frame from the camera was acquired and digitized using a 1440A Digidata and the Axoscope 10 software (Molecular Devices).

The success rate of this experiment depends on the combined success of the P0 stereotaxic virus injections and the window implant surgery. We performed this on 2 mice out of 18 for the VMT axons imaging experiments in the CA1 *slm* region and 11 mice out of 64 (EC: 5/36; VMT: 6/28) for the DREADD experiments.

Histological processing. For anatomical validation of the stereotaxic injections in VMT and EC, 50 μm brain slices from P7 mice injected either in EC or in VMT at P0 were processed as described previously (Dard et al., 2022). Briefly, under deep anesthesia (Domitor and Zoletil, 0.9 and 60 mg/kg, respectively) pups were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M PBS (PBS tablets, 18912-014, Life technologies). Brains were post-fixed overnight at 4°C in 4% PFA in 0.1M PBS, washed in PBS, cryo-protected in 30% sucrose in PBS, before liquid nitrogen freezing. Brain slices were obtained by using a cryostat (CM 3050S, Leica) and collected on slides. Then, they were processed for immunocytochemical labelling. Briefly, sections were bathed in PBS-0.3% Triton (PBST) and 10% normal donkey serum (NDS), then incubated overnight with the primary antibody rabbit anti-dsRed (1:1000 in PBST; Clontech, AB_10013483) at 4°C. After several washes with PBST, slices were incubated 2 hours at room temperature with a secondary antibody donkey anti-rabbit Alexa 555 (1:500 in PBST, ThermoFisher, A31570). After Hoechst counterstaining, slices were mounted in Fluoromount and kept at 4°C until microscope acquisition.

For the Emx1-Cre and VGluT2-Cre mice used for the *in vivo* experiments, brains were directly post-fixed overnight at 4 °C in 4% PFA in 0.1M PBS, washed in PBS, sectioned using a vibratome (VT 1200 s, Leica) into coronal 150 μm-thick slices and collected on slides. Then immunocytochemistry was performed as previously described to amplify mCherry signal.

For biocytin-filled patched cells, slices were fixed overnight at 4 °C in 4% PFA in 0.1M PBS, rinsed in PBS, cryo-protected in 30% sucrose in PBS, before freezing within liquid isopentane cooled with dry ice. Slices were incubated with 10% NDS in PBST and then in a mix containing streptavidin-488 (1:2000 in PBST) and primary antibodies rabbit anti-dsRed (1:2000 in PBST) for 5 days at room temperature. As described above, slices were then incubated 4 hours at room temperature with secondary antibody donkey anti-rabbit Alexa 555 (1:500 in PBST) and mounted in Vectashield® with DAPI (H-1200, Vector).

For brain tissue clearing, fixed brains from P7 mice injected with AAV8-Syn-Chronos-tdTomato-WPRE-bGH either in EC or in VMT at P0 were used. We used Animal Tissue Clearing Reagent CUBIC kit (CUBIC-L [T3740] and CUBIC-R [T3741], Tokyo Chemical Industry). Briefly, fixed brains were incubated in a CUBIC-L solution diluted by half in distilled water (50 % CUBIC-L) at room temperature overnight. Then brains' lipids were removed by immersing them in pure CUBIC-L solution for 5 days at 37°C. The solution was changed every 2 days. After 5 days, brains were washed in 0.1 M PBS solution for a whole day. Then, brains were incubated in a CUBIC-R solution diluted by half in distilled water (50 % CUBIC-R) at room temperature overnight and in the pure CUBIC-R solution until the acquisition within a 24h delay.

Image acquisition. Epifluorescence images were obtained with a Zeiss AxioImager Z2 microscope coupled to a camera (Zeiss AxioCam MR3) with an HBO lamp associated with 470/40, 525/50 and 545/25 filter cubes. Confocal images were acquired with a Zeiss LSM-800 system equipped with a tunable laser providing an excitation range from 405 to 670 nm. For the analysis of the proximo-distal and radial distribution of VMT and EC inputs in CA1 region, 5 µm thick stacks were taken from the surface (z=1 µm, pixel size=0.3 µm) with the confocal microscope using a Plan-Apochromat 20x/0.8 objective. For the analysis of EC inputs distribution in the CA1 region of patched-cell slices, tiles were acquired with the epifluorescence microscope using the ApoTome.2 module (Zeiss) focused on the patched - cell soma using an EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 objective. For the analysis of the number of contacts made by labelled thalamic or entorhinal afferents on biocytin filled CA1 *s/m* GABAergic cells, confocal stacks centered on the soma and neurites of biocytin filled cells were acquired at constant resolution (0.065 µm/pixel) and z-step (0.5 µm) with a plan-achromat 40x/1.4 oil using a 2,4x scan zoom.

Whole cleared brain acquisitions were performed using the UltraMicroscope II (LaVision Biotec) coupled with a superK EXTREME (NKT photonics) Supercontinuum laser. Excitation wavelength was selected with band pass filters (470/40 and 560/40) and converted as a light sheet of 4 µm thickness. Two horizontal z-stacks, one for each hemisphere, were

taken with a 2x objective (NA: 0.5) plus a x0.63 optical zoom (spatial resolution: 4.52x4.52x4.6 μ m). Z-stacks were merged using the pairwise stitching plugin on Fiji.

DATA PRE-PROCESSING

Ex vivo 2-photon calcium imaging pre-processing. We used custom designed MATLAB software allowing for the segmentation and extraction of calcium traces from labelled cells. Because, for each light stimulation, 1 or 2 frames were saturated, we replaced the saturated frames by the 1 or 2 frames that preceded them. Then, onsets and offsets of calcium signals were detected using another custom designed MATLAB program (Bonifazi et al., 2009). Network synchronizations (GDPs) were detected as synchronous onsets peaks including more neurons than expected by chance, as previously described (Bonifazi et al., 2009).

In vivo extracellular electrophysiological recordings pre-processing. Multi-unit activity (MUA) was detected from bandpass-filtered (300-6000 Hz; two successive zero-phase, 3rd and 5th order Chebychev filters, respectively) local field potentials (LFP) recorded from each channel. MUA action potentials were detected when the signal reached a threshold equal to 4,5 times the estimated standard deviation from the signal distribution. Any activity that was detected simultaneously on more than four channels was considered as an artifact and discarded. MUA frequency across time was then estimated in 0.5 s bins; smoothed using a 30 s moving average filter and normalized to the mean MUA frequency measured in the first 10 minutes of recording.

In vivo 2-photon calcium imaging data pre-processing.

Motion correction. Image series were motion corrected using the NoRMCorre algorithm available in the CalmAn toolbox (Pnevmatikakis and Giovannucci, 2017).

Cell segmentation. Cell segmentation was achieved using Suite2p (Pachitariu et al., 2017). Axonal branch segmentation was performed using Suite2p or Fiji (<http://fiji.sc>) where ROIs were manually defined.

Cell type prediction. Cell type prediction was done using the DeepCINAC cell type classifier (Denis et al., 2020). Briefly, a neuronal network composed by CNN (Convolutional Neural Network) and LSTM (Long Short Term Memory) was trained using labelled GABAergic neurons, pyramidal cells and noisy cells to predict the cell type using 100 frames long movie patches centered on the cell of interest. Each cell was classified as GABAergic neuron, pyramidal cell or noise. Cells classified as 'noisy cells' were removed for further analysis.

Activity inference. For 2-photon calcium imaging of the pyramidal cell layer, activity inference was done using DeepCINAC classifiers (Denis et al., 2020). Briefly, a classifier composed by

CNN and LSTM was trained using manually labelled movie patches to predict neuronal activation based on movie visualization. Depending on the inferred cell type, activity inference was done using either a general classifier or an interneuron specific activity classifier. Activity inference results in a “cells x frames matrix” giving the probability for a cell to be active at any single frame. We used a 0.5 threshold on this probability matrix to obtain a binary activity matrix considering a neuron as active from the onset to the peak of a calcium transient.

For 2-photon calcium imaging of VMT axonal branches in the CA1 *s/m*, $\Delta F/F$ was calculated and a Gaussian low-pass filter was applied to denoise the trace. Frames with z-movement were excluded from the traces to determine the calcium transients’ threshold. This threshold corresponded to the median of the free z-movements denoised trace plus 3 times its interquartile range. Significant transients were conserved if their onset was out of a z-movement period.

Behavior analysis. Analysis of video tracking was done using CICADA and behavior was manually annotated in the BADASS (Behavioral Analysis Data And Some Surprises) GUI (Denis et al., 2020). Based on the video tracking three categories of movements were described: complex movements, startles and twitches (irrespectively of the limb).

Neurodata without border (NWB) embedding. To be analyzed, all of the preprocessed data were combined into a single NWB:N (Rübel et al., 2022) file per imaging session containing imaging data and metadata, cell contours, cell type prediction, neuronal activity inference and animal behavior.

DATA ANALYSIS

Ex vivo 2-photon calcium imaging and optogenetics analysis. The analysis of the photostimulation effect on network activity is based on the computing of Inter GDP Intervals (IGI) and stimulation-associated-GDPs. To establish whether the photostimulation of external inputs was able to influence the frequency of GDPs, we calculated the IGI during the photostimulation period and the non-stimulation periods (control). To assess whether a phasic light stimulation of the VMT or EC inputs was able to lock GDP occurrence within one second following the stimulation (same time window as previously used in (Bonifazi et al., 2009)), we counted the number of GDPs occurring within a 1 second time window after light stimulations. To evaluate whether the number of GDPs following light stimulations was higher than by chance, we compared this value to the 99th percentile of the distribution of the number of GDP following light simulation obtained from 1000 surrogates.

Synchronous Calcium Event (SCE) detection in *in vivo* recordings. Synchronous Calcium Events were defined as the imaging frames in which the number of co-active cells exceeded

the chance level as estimated using a reshuffling method as described previously (Dard et al., 2022). The SCE detection threshold, which corresponds to the minimal number of significantly co-active cells, was determined using the first ten minutes of the recording and applied to the other ten-minute imaging blocks.

Patch clamp recordings and optogenetics analysis of ex vivo recordings. The analysis of the monosynaptic responses evoked by the light stimulation of EC or VMT inputs on CA1 *slm* GABAergic neurons and pyramidal cells was performed using Clampfit 10 (Molecular Devices). We measured the delay between the onsets of the light pulse and the cell response and its amplitude. The paired pulse ratio (PPR) and the NMDA/AMPA ratio (N/A ratio) was calculated based on the amplitude measures. For the analysis of the polysynaptic responses evoked by the light stimulation train applied to external inputs, we used the TaroTools toolbox (<https://sites.google.com/site/tarotoolsregister>) for IgorPro (WaveMetric). This allowed us to extract the time stamps of the PostSynaptic Currents (PSCs). Then, the polysynaptic effect of the stimulation train was estimated with the Peri-Stimulus Time Histogram (PSTH) performed with a MATLAB custom-made script.

Distribution of VMT and EC afferents in the CA1 region. Analysis of the anatomical distribution of VMT and EC putative axons in the CA1 area was performed on confocal or epifluorescence images using Fiji (<http://fiji.sc>). First, tissue auto-fluorescence was removed by subtracting the mean value of a square ROI placed on the CA3 region. For axonal density measurements along the radial axis, a line was drawn from the alveus to the hippocampal fissure in the middle of the CA1 region and the plot profile plugin was applied. For the axonal density measurement along the proximo-distal axis, the CA1 *slm* ROI was defined manually, straightened out and the plot profile was done along the proximo-distal axis. For each profile plot, the distance was given as a percentage relative to the maximal distance; the intensity profile was normalized to the peak.

EC and VMT putative contacts onto CA1 *slm* neurons. Appositions between thalamic or entorhinal tdTomato positive axons and biocytin-filled somata and dendrites, considered as putative contacts, were counted manually throughout z-stacks using the multi-point tool plugin in Fiji (<http://fiji.sc>). The total red and green surface per cell was calculated as the sum of the red and green surfaces measured for each stack using the isodata threshold Fiji plugin.

Statistics. Statistical tests were performed using GraphPad (Prism). We used either two-tailed Mann-Whitney, Student t-test or Welch t-test, depending on the results for normality and homoscedasticity tests, to compare data from axonal density experiments, *ex vivo* calcium

imaging and patch-clamp recordings. For *in vivo* 2-photon calcium imaging, cell transients frequency was compared between the 0-10 minutes and the 40-50 minutes using Wilcoxon test. The number of SCEs was compared between the two periods of the 3 experimental conditions (EC, VMT and Ctrl) using two-way ANOVA.

RESULTS

Spatial distribution of VMT and EC inputs onto the CA1 region at early postnatal stages

The distribution of extra-hippocampal axons in the CA1 region has been described in adult mice. In particular, it is well established that VMT inputs target mainly the ventro-intermediate part of CA1 (Hoover and Vertes, 2012). In order to determine the possible influence of VMT and EC inputs onto early CA1 dynamics, we first analyzed their distribution along the radial (in the CA1, from *alveus* to *slm*) and proximo-distal (in CA1 *slm*, from CA2 to subiculum) anatomical axes, in the ventro-intermediate CA1 region. To this aim, mouse pups were stereotactically injected with a virus expressing tdTomato (together with the fast opsin Chronos (Klapeetke et al., 2014); (Ronzitti et al., 2017) for later optogenetic experiments) either in the ventral midline thalamus (VMT, **Figure S1**) or in the entorhinal cortex (EC, **Figures S2A, S2B**). Injections were performed at birth (P0, **Figure 1A**). We analyzed the pattern of innervation of CA1 by VMT and EC in fixed brain slices (five to seven days after injection) and found that both inputs innervated the *slm* (**Figure 1B, Supplementary Movies 1 and 2**). As expected (Supèr and Soriano, 1994), EC axons were also visible in the *alveus* as well as in the contralateral CA1 *slm* (**Figure S2C, Supplementary Movie 1**); VMT projections are mainly present in the ventro-intermediate CA1 (**Supplementary Movie 2**). These observations are consistent with previous studies (Hartung et al., 2016; Supèr and Soriano, 1994). EC inputs were present all along the proximo-distal axis in the CA1 *slm*, but innervated more densely the proximal part of the CA1 *slm*, at the CA2 border (n=4 mice, 18 slices; **Figure 1C, left panel**). Conversely, VMT inputs innervated the distal CA1 *slm*, at the border with the subiculum (n=4 mice, 16 slices; **Figure 1C, left panel**). The spatial segregation of EC and VMT inputs along the proximo-distal axis was quantified by measuring the relative distance of the peak of axonal fluorescence from the distal limit of CA1 (border with the subiculum) (VMT: mean=20 ± 8 %, n=16 slices, 4 animals, EC: mean=69 ± 19 %, n=18 slices, N=4 animals, Welch's t-test, p<0.0001; **Figure 1C, right panel**). On the radial axis, EC and VMT inputs were mostly concentrated in the CA1 *slm* (**Figures 1B and D**). This anatomical segregation of EC and VMT inputs suggests that, if active, they may influence different CA1 circuits during early postnatal development.

Modulation of local CA1 dynamics by photostimulation of EC or VMT inputs

While a recent study has shown that the EC is active in neonatal rodents (Valeeva et al., 2019), it remains unclear whether the VMT input is also active at this developmental stage. To address this question before the stimulation experiments, we performed *in vivo* 2-photon calcium imaging from VGluT2-expressing axons in the *slm* in neonatal mouse pups. We used virus injections at birth to express the axon-enriched calcium indicator protein GCaMP6s (Broussard et al., 2018) Cre-dependently in VGluT2-Cre mice, and td-Tomato (independently from Cre) to locate the *slm* (see methods; **Figure S3A-C**). Since VGluT2 tags subcortical excitatory neurons (including thalamic neurons), calcium activity in VGluT2+ fibers in the *slm* largely reflects activity of the VMT input. We observed spontaneously occurring calcium transients about once every 5 minutes in boutons expressing GCaMP6s (median=0.24 transients/minute [iqr=0.34]; **Figures S3D, S3E**). We conclude that together with activity originating from EC, VMT inputs can impact CA1 dynamics during early postnatal development.

In order to test the influence of these extrinsic inputs onto local CA1 dynamics, we stimulated VMT or EC axonal fibers in hippocampal slices using an optogenetic approach. We focused on the modulation of the Giant Depolarizing Potentials (GDPs), the main type of network activity pattern spontaneously occurring in hippocampal slices between P5 and P7 (Ben-Ari et al., 1989). This pattern can be considered as “internally-generated” as it is embedded in local circuits, being observed in the disconnected CA1 *ex vivo*. We performed calcium imaging combined with CA1 *slm* photo-activation of external afferents in horizontal slices from P5-7 SWISS mice. The slices were loaded with the calcium indicator Fura2-AM as previously described (Crépel et al., 2007). Pups were injected at birth with a Chronos/tdTomato virus in the EC or VMT, as described above. An optic fiber placed above the CA1 *slm* was used for photoactivation of either pathway using blue light. Neuronal activity was recorded in the CA1 pyramidal cell layer using 2-photon calcium imaging (**Figure 2A, Supplementary Movies 3 and 4**). As expected spontaneous synchronous activation of a large portion of imaged cells corresponding to GDPs could be observed ((Crépel et al., 2007) **Figures 2B1, 2C1**). Photoactivation of VMT axons affected the time interval between consecutive GDPs (Inter GDP Interval, IGI) in 5 out of 8 slices (n=7 animals; **Figures 2B2, 2D1**). In these 5 slices, GDPs occurred at a higher frequency since a decrease in IGI during photoactivation was observed in 4 slices and an increase in one (**Supplementary Tables 1 and 2**). Similarly, photoactivation of EC terminals affected IGIs in 4 out of 7 slices, with a decrease in IGI observed in three cases but one (n=5 animals; **Figures 2C2, 2D1, Supplementary Tables 1 and 2**). We conclude that the photostimulation of VMT or EC inputs modulates the occurrence of CA1 GDPs, with an increase in GDP frequency being more frequently observed.

We next asked whether such photoactivation could directly trigger synchronization of neuronal activity by examining whether GDPs had a higher probability than chance to occur in the one second window following light stimulation. We observed that GDPs were paced by VMT in 3 out of 8 slices (**Figures 2B3, 2D2, S4A**) and in 4 out of 7 slices in the case of EC inputs photoactivation (**Figures 2C3, 2D2, S4B**). Of note, CA1 dynamics were not affected by light in slices that did not express the opsin (n=4 slices, N=2 animals, **Figure S4C**). Detailed results are reported in Supplementary Table 1 and 2. Together, this shows that VMT and EC inputs can modulate spontaneous “internally-generated” CA1 network activity (**Figure 2D3**). We next dissected the local CA1 circuits recruited by VMT and EC inputs.

VMT and EC inputs recruit different CA1 local circuits

We first examined how EC and VMT terminals impinge onto CA1 *slm* GABAergic neurons. To this aim, we performed patch-clamp recordings from CA1 *slm* neurons in hippocampal slices from P5-7 mice injected with the Chronos/tdTomato virus in the EC or VMT at birth as above (**Figure 3A**). We first examined the nature of VMT and EC synaptic transmission. At the reversal potential for excitatory postsynaptic currents (EPSCs), photostimulation of EC but not VMT inputs could evoke monosynaptic GABAergic responses in some CA1 *slm* GABAergic neurons (7/29 cells; **Figure S5A**), indicating a small but significant contribution of GABAergic transmission to long-range communication from EC as early as P5-7, as in the adult (Basu et al., 2016; Melzer et al., 2012). Thus, we recorded EPSCs evoked by stimulation of the EC inputs in the presence of SR95531, a GABA_AR blocker, in order to measure the impact of glutamatergic transmission-mediated inputs. Recorded cells distributed along the disto-proximal axis of CA1 *slm* (**Figure 3B**) in locations with detectable tdTomato signal (**Figures S5C, S5D left panels**). Photostimulation of both VMT and EC inputs evoked short-delay EPSCs (monosynaptic glutamatergic responses) in more than two-thirds of the CA1 *slm* neurons (VMT: 68 %, n=47 cells, EC: 67 %, n=34 cells; Delay: VMT: 3.9 ms, n=11 cells, EC: 3.3 ms, n=10 cells; **Figures 3C, S5B left panel**). Moreover, the cells responding to the photostimulation of either afferents were more densely decorated with putative contacts than non-responding cells (VMT: With EPSCs: median=0.18 contacts/stack [iqr=0.13], n=14 cells, Without EPSC: median=0.09 contacts/stack [iqr=0.23], n=11 cells, Mann-Whitney test, p=0.0014; **Figure S5C, middle panel**) or EC (With EPSCs: median=0.15 contacts/stack [iqr=0.28], n=17 cells, Without EPSC: median=0.05 contacts/stack [iqr=0.07], n=9 cells, Mann-Whitney test, p=0.0035; **Figure S5D, middle panel**). Such difference was not due to different background signal as for both inputs, the ratio between cell (green) and axon volume (red) did not significantly differ between responding- and non-responding cells (VMT: With EPSCs: median=0.19 [iqr=0.64], n=14 cells, Without EPSC: median=0.14 [iqr=0.19], n=11 cells, Mann-Whitney test, p=0.0954, **Figure S5C, right panel**; EC: With

EPSCs: median=0.11 [iqr=3.59], n=16 cells, Without EPSC: median=0.72 [iqr=4.53], n=9 cells, Mann-Whitney test, p=0.3014, **Figure S5D, right panel**). Morphological inspection of the recorded neurons that were filled with neurobiotin indicated that these cells qualified as putative GABAergic interneurons. We could distinguish putative Neurogliaform cells (NGF) from other CA1 *s/m* GABAergic neurons (*s/m*INs; **Figure 3D**), based on anatomical criteria, which included their dense axonal arborization covering a larger territory than their short dendrites (Chittajallu et al., 2017; Tricoire et al., 2010). The fraction of *s/m* interneurons responding to VMT or EC stimulation was comparable (Fisher's exact test, p>0.9999, **Figure 3C**). Among these *s/m* interneurons, NGF cells were the most likely to respond (NGF: 86 %, n=28 cells, *s/m*INs: 51%, n=37 cells ; Fisher's exact test, p=0.0042, **Figure S5E**). We conclude that CA1 *s/m* interneurons, and notably the NGF cells, have an equal probability to be targeted by EC or VMT inputs. These responses to both inputs were mediated by AMPA- and NMDA-R activation (**Figure 3E**) but with EC afferents photostimulation evoking AMPA-R-mediated PSCs of higher amplitude than VMT (VMT: median=24 pA [iqr=121.2], n=10 cells, EC: median=71 pA [iqr=903.1], n=11 cells, Mann-Whitney test, p=0.0610; **Figure 3F**). Two groups of cells could be distinguished based on the amplitude of their AMPA-R-mediated responses to EC afferent photostimulation, one displaying small amplitude EPSCs (median=28 pA [iqr=58.0], n=6 cells) and the other large amplitude EPSCs (median=719 pA [iqr=386.5], n=5 cells, Mann-Whitney test, p=0.0043; **Figures 3E, 3F**). The cells displaying large EPSCs were closer to the hippocampal fissure and CA2 than the small EPSC ones (Radial axis: small EPSCs: median=0.68 [iqr=0.16], n=6 cells, large EPSCs: median=0.79 [iqr=0.09], n=5 cells, Mann-Whitney test, p=0.0173, **Figures 3G, 3H**; Disto-proximal axis: small EPSCs: median=0.48 [iqr=0.25], n=6 cells, large EPSCs: median=0.85 [iqr=0.22], n=5 cells, Mann-Whitney test, p=0.0043, **Figures 3G, 3I**). The presynaptic release probabilities of both afferents were comparable (EC: median=1.02 [iqr=2.19], n=11 cells, VMT: median=0.81 [iqr=2.75], n=10 cells, Mann-Whitney test, p=0.55; **Figure S5B, middle panel**). Similarly, the ratios between NMDA- and AMPA-R mediated PSCs were similar (EC: median=2.05 [iqr=11.81], n=9 cells, VMT: median=2.14 [iqr=3.90], n=9 cells, Mann-Whitney test, p=0.9314; **Figure S5B right panel**). Altogether, these results indicate that both EC and VMT inputs project directly onto CA1 *s/m* interneurons, including NGF cells as early as the end of the first postnatal week, with EC inputs innervating preferentially cells located in the proximal part of the CA1 *s/m*.

In order to describe the connectivity of EC and VMT afferents onto CA1 pyramidal neurons, we next performed patch-clamp recordings from these neurons in the *stratum pyramidale*. As above, recordings were performed in ventral hippocampal slices of P5-7 mice injected with Chronos/tdTomato expression in the EC or VMT (**Figure 4A**). Putative pyramidal

neurons were randomly sampled along the radial axis. All cells were filled with biocytin to confirm their identity *post hoc* and recover their axonal and dendritic distribution. The distal dendrites of all morphologically-recovered cells extended into the CA1 *slm* (**Figure 4B**). A much higher fraction of CA1 pyramidal cells was recruited by EC afferents photostimulation as compared to VMT (VMT: 7 %, n=27 cells, EC: 57 %, n=14 cells, Fisher's exact test, p=0.0012; **Figure 4D1**). The percentage of monosynaptic response across trials was significantly higher when stimulating EC afferents than VMT (VMT: median=0,00 % [iqr=100], n=27 cells, EC: median=55% [iqr=100], n=14 cells, Mann-Whitney test, p=0.0010; **Figure 4D2**). Among the responsive cells, VMT and EC photostimulation evoked EPSCs with similar short delays (VMT: 4.05 ms, n=2 cells, EC: 5.5 ms, n=8 cells; **Figures 4C, S6A**). Overall, VMT afferents photostimulation evoked mainly polysynaptic events in the form of significant increases in EPSCs frequency within one second from the start of the photostimulation (n=12 cells, peak value=0.77, above chance level; **Figures 5A1, 5A2**). The frequency of EPSCs was significantly increased during VMT stimulation (Stim) as compared with the period without stimulation (Stim: mean=8.2 ± 5.4 Hz, No Stim: mean=1.25 ± 0.77 Hz, n=20 cells, Paired t-test, p<0.0001; **Figure 5A3**). Similar increases in frequency were observed when recording Inhibitory Postsynaptic Currents (IPSCs) at the reversal potential for glutamatergic inputs (n=20 cells, peak value=0.74, above chance level, **Figures 5B1, 5B2**; Frequency: Stim: median=12.20 Hz [iqr=26.70], No Stim: median=1.57 Hz [iqr=5.44], n=12 cells, Wilcoxon test, p=0.0005, **Figure 5B3**). These results suggest that the modulation of CA1 pyramidal cells by VMT inputs is mainly polysynaptic and involves local recurrent circuits. Blocking GABAergic transmission significantly decreased EPSCs frequency during the photostimulation period (Ctrl: median=14.80 Hz [iqr=13.50], SR95531: median=3.556 Hz [iqr=5.40], n=7 cells, Wilcoxon test, p=0.0156; **Figures 5C1, 5C2**). Results were confirmed by normalizing events frequency during the stimulation by non-stimulation period frequency (Ctrl: median=10.89 Hz [iqr=11.80], SR95531: median=8.277 Hz [iqr=9.35], n=7 cells, Wilcoxon test, p=0.0469; **Figures S6B, S6C**). Altogether we conclude that VMT inputs are mainly activating GABAergic *slm* neurons which in turn produce, in slices, polysynaptic excitatory events in CA1 pyramids. This is in stark contrast with the monosynaptic EC drive onto CA1 pyramidal neurons.

EC and VMT both exert an excitatory drive onto CA1 circuits in vivo but only EC drives synchronization

We last examined the influence of the two extrinsic inputs on the developing CA1 neuronal activity *in vivo*. To this aim, we injected newborn mice with a virus inducing the expression of the inhibitory DREADD receptor, hM4D(Gi) (AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virus), in either the EC or the VMT. For EC expression, we used the Emx1-Cre driver line which specifically targets excitatory cortical neurons. For VMT expression, we used the

VGluT2-Cre driver line which specifically targets excitatory subcortical neurons, including thalamic neurons. We imaged the calcium activity in the CA1 pyramidal layer of non-anesthetized pups (P6-8, n=12 pups) using 2-photon excitation of GCaMP6s-expressing neurons (see methods; **Figure 6A**). We only considered experiments for which we confirmed *post hoc* that DREADD-expressing axons reached the *s/m* below the imaged area (**Figure S7A**). As a first step, we calibrated the time course of CNO action with extracellular electrophysiological recordings in the CA1 region of Emx1-Cre mouse pups expressing hM4D(Gi) in the hippocampus. A decrease in the number of spikes was observed forty minutes after CNO subcutaneous injection (**Figures S8**). Based on this time course of CNO action, the multineuron calcium activity recorded during the first ten minutes (0-10) of two-photon imaging was compared to the fortieth to fiftieth minute of recording after CNO injection (40-50, **Figure 6A**). The FOVs were the same between 0-10 and 40-50 minutes periods (**Figures 6B, S7C, Supplementary Movies 5-8**), allowing to track the activity of the same neurons. As previously described (Dard et al., 2022; Mohns and Blumberg, 2008; Valeeva et al., 2019), spontaneous neuronal activity observed during the first ten minutes (0-10) alternated between recurring population bursts (Synchronous Calcium Events, SCEs), and periods of low activity (**Figures 6C, 6D, S7D, S7E**). The fraction of cells recruited in SCEs (Dard et al., 2022: median= 0.50 [iqr=0.14], N=13 animals; 0-10: median=0.48 [iqr=0.27], N=12 animals, Mann-Whitney test, p=0.2254; **Figure S7B left panel**) and the transients frequency (Dard et al., 2022: median=1.4 [iqr=1.9], N=13 animals; 0-10: median=1.2 [iqr=2.5], N=12 animals, Mann-Whitney test, p=0.2701; **Figure S7B right panel**) during that initial period were similar to our previous study (Dard et al., 2022). Pharmacogenetic inhibition of VMT or EC resulted in a significant decrease in the frequency of the calcium transients in cells of the pyramidal layer (EC: 0-10: median=0.48 transients/min [iqr=10.91]; 40-50: median=0.10 transients/min [iqr=12.44], n=2522 cells, N=3 animals, Wilcoxon test, W=-1691767, p<0.0001; **Figure 6E top panel**; VMT: 0-10: median=0.77 transients/min [iqr=11.39]; 40-50: median=0.57 transients/min [iqr=15.02], n=1115 cells, N=3 animals, Wilcoxon test, W=-186998, p<0.0001; **Figure 6E bottom panel**). However, the magnitude of EC inhibition was approximately four times greater than that of VMT. We next used a previously developed deep-learning based method (Dard et al., 2022; Denis et al., 2020) to distinguish between putative pyramidal cells (Pyr) and GABAergic neurons of the *so/sp* layers (*so/sp*INs; **Figures 6F**). EC inhibition decreased the frequency of transients of both cell types (*so/sp*INs: median=63% of 0-10 [iqr=430.9], n=164 cells, N=3 animals, One sample Wilcoxon test, p<0.0001; Pyr: median= 32% of 0-10 [iqr=1501], n=1992 cells, N=3 animals, One sample Wilcoxon test, p<0.0001; **Figure 6F top panel**). In contrast, VMT inhibition only affected pyramidal neurons (*so/sp*INs: median=99.00% of 0-10 [iqr=5900], n=284 cells, N=3 animals, One sample Wilcoxon test, p=0.7786; Pyr: median= 61.54% of 0-10 [iqr=1400], n=722 cells, N=3 animals, One sample

Wilcoxon test, $p < 0.0001$; **Figure 6F bottom panel**). The controls did not show any difference in the frequency of transients (**Figures S7D, S7E, S7F, S7G**). We last analyzed the impact of inhibition of these pathways on SCEs, and found that only EC inhibition would result in a significant decrease in the number of SCEs within 40-50 minutes (EC: $n=3$ animals; VMT: $n=3$ animals; Ctrl: $n=5$ animals; 2-way ANOVA followed by Šidák's multiple comparisons test, epochs were different for EC inputs, $p=0.0021$; **Figure 6G**). Since CA1 SCEs are generally preceded by spontaneous motor twitches (Dard et al., 2021; Mohns and Blumberg, 2008; Valeeva et al., 2019), we finally analyzed the pups spontaneous movements but could not find any significant decrease following CNO exposure (**Figure S7H**). Thus, both EC and VMT control pyramidal cell activity in the neonatal CA1, but only EC controls pyramidal cell synchrony driven by motor twitches. This suggests that sensorimotor activity is mainly relayed by the EC to local CA1 circuits.

DISCUSSION

Our results demonstrate that early spontaneous activity in CA1 is not only embedded within local CA1 circuits as in the adult (Zutshi et al., 2021), but rather under the combined influence of two extrinsic inputs originating in the VMT and EC. These two inputs are integrated locally through distinct pathways with VMT inputs preferentially targeting *s/m* GABAergic neurons.

Early CA1 dynamics are modulated by extra-hippocampal inputs

Early spontaneous activity in any developing brain region is expected to emerge from the integration of spontaneously active extrinsic inputs originating from more developmentally advanced areas (Donato et al., 2017), onto local circuits capable of self-generating coordinated activity patterns, even when isolated *ex vivo*. Accordingly, we found that both the thalamus and the entorhinal cortex, both older than CA1 -at least for the lateral part of the EC- (Bayer, 1980; Nakagawa, 2019), can modulate the baseline activity and synchronization of local CA1 circuits when inhibited or activated. Activation of these extrinsic inputs is more likely to result in increased network excitability while their inhibition decreases it. Of note, we could not distinguish between LEC and MEC given that targeting the EC at birth with spatial precision already represented an experimental feat. Like the EC inputs (Valeeva et al., 2019), the VMT inputs are spontaneously active in the CA1 region during the first postnatal week. Due to the difficulty to image at a depth of 700 μm combined with the success rate of stereotaxic injections in the VMT at birth, the number of VMT axonal imaging experiments is low and analysis was

restricted to quiet rest periods to avoid movement artifacts; in particular we cannot exclude that these inputs could also be activated during spontaneous motor twitches.

The link between the VMT or the EC activity and CA1 dynamics had been previously suggested using simultaneous extracellular electrophysiological recordings in CA1 and the EC or VMT (Hartung et al., 2016; Valeeva et al., 2019). Here, by using chemogenetic tools, we demonstrate a causal link between the activities originating from both inputs and CA1 activity. The time course and strength of the pharmacogenetic inhibition of VMT and EC activity *in vivo* using electrophysiological recordings and performed control experiments where either only CNO or the hM4D(Gi) receptor are provided. Such controls are essential given the possible nonspecific effects of this approach (Roth, 2016). The frequency of single cell calcium transients and of SCEs were used as quantitative readouts of activity. Early sharp waves (eSPWs) and GDPs are likely the electrophysiological correlates of SCEs, measured with calcium imaging *in vivo* and *ex vivo*, respectively, as they are significant network events occurring at similar rates in the same preparations. However, dual simultaneous recordings are needed to confirm this statement.

Our reported effects of VMT or EC inhibition on CA1 dynamics may not only result from direct thalamo- of entorhinal-hippocampal connectivity as both inputs are highly connected to several structures. For example, the VMT innervates the EC as well (Weel and Witter, 1996), and its inhibition could also induce a decrease in the activity of the EC, which would in turn affect the CA1 region. VMT and EC are not the sole extrinsic sources of glutamatergic excitation to CA1. For example, the septum also densely projects to CA1 (Bokor et al., 2002; Kerr et al., 2007), displays an early maturation schedule with a preferential targeting of interneurons (Supèr and Soriano, 1994), conveys proprioceptive inputs and modulates intrinsic CA1 dynamics (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2018). However, in contrast to the VMT and the EC, the laminar profile of septal projections does match the excitatory currents driving eSPWs, with their preferential current sink in the *stratum lacunosum moleculare* (*slm*) (Valeeva et al., 2019). The evolution of the current source density profile of eSPWs is interesting. The dual sinks observed in the *stratum radiatum* (*sr*) and *slm* before P5 likely reflect the activation of the entorhino-hippocampal pathway. However, a majority of eSPWs after P5 display a single sink in the *slm* (Valeeva et al., 2019). This may indicate the selective activation of layer 3 MEC neurons from this time point. Whether there are indeed two types of eSPWs with different CSD profiles and associated SCEs depending on their main extra-hippocampal drive remains to be further investigated. Our experiments focused on the period with single sinks in *slm*, possibly suggesting a stronger contribution of EC layer III activity in driving SCEs. Future work is needed to study the comparative developmental evolution for the relative weight of VMT and EC inputs to CA1 activity and to describe the *in vivo* extracellular electrophysiological signature of VMT activity in CA1. Given the protracted development of

the mPFC, one possibility could be that the contribution of VMT in driving SCEs *in vivo* is delayed as compared to the EC.

Ex vivo experiments allow for the isolation of internally-generated spontaneous activity (GDPs). In these conditions, we found that the photoactivation of the VMT or the EC axons in the CA1 *slm*: (1) can trigger synchronization in the form of GDPs time-locked to the stimulation (in most cases for EC stimulation, in less than half of the cases for VMT stimulation); (2) increased network excitability as revealed by an increase in the rate of GDPs (although in a minority of cases we observed a decrease). The slight difference in the driving of GDPs by VMT and EC likely reflects their integration through different local circuits (see below), as well as their different strength as revealed by the amplitude of the postsynaptic EPSCs in response to stimulation (see also below).

The modulation of CA1 network activity by subcortical inputs from the VMT is reminiscent of the modulation of neocortical bursts by thalamic inputs (Martini et al., 2021; Minlebaev et al., 2011; Mizuno et al., 2018; Molnár et al., 2020). Such bottom-up thalamic drive is integrated within intracortical circuits capable of self-organizing their activity into network bursts, thus producing co-existing network patterns. Interestingly, these thalamic inputs transiently contact local interneurons in the neocortex, the same way VMT inputs are relayed by CA1 *slm* interneurons (Ibrahim et al., 2021; Marques-Smith et al., 2016; Molnár et al., 2020; Tuncdemir et al., 2016).

Differential intrahippocampal integration of VMT and EC inputs

Our results demonstrate that the VMT and EC inputs integrate different CA1 circuits: (i) their axonal projection distributions differ along the 3 main hippocampal axes; (ii) they display different probabilities to recruit CA1 pyramids; (iii) their *in vivo* network impact diverges.

A striking anatomical segregation of VMT and EC axonal afferents in the CA1 *slm* can be observed using confocal imaging of their respective projections labeled by targeted virus injection at birth. These targeted injections are technically challenging and the site of virus infection may be slightly larger than the anatomical borders of the EC and VMT (**Figures S1, S2**). Still, the labeled axonal tracts are almost exclusively observed in the *slm* of the ventral to intermediate CA1, as expected from anatomical descriptions in the adult (Weel and Witter, 1996). Adding to this differential distribution along the dorso-ventral CA1, VMT and EC afferents segregate along the proximo-distal axis, with VMT targeting the distal *slm* (closer to the subiculum) and EC the proximal *slm* (closer to CA2). This proximo-distal segregation is well described for EC afferents in the adult with LEC projecting distally, like the VMT and MEC proximally (Masurkar et al., 2017, 2020). This may suggest that our stereotaxic injections into the EC were biased towards the MEC at the expenses of the LEC.

This anatomical segregation of projections is functionally reflected in the distribution of the postsynaptic cells responding to their stimulation. Indeed, neurons activated by EC inputs were located in the proximal CA1 *slm*, while neurons responding to VMT inputs were located in the distal *slm*. The probability to observe an EPSC was confirmed by *post hoc* anatomical analysis to report indirectly the number of presynaptic inputs. Therefore the VMT and EC inputs should activate different circuits. There are two major subtypes of neurons in the CA1 *slm*, the glutamatergic Cajal Retzius (CR) cells and the GABAergic interneurons, most of which of the Neurogliaform (NGF) subtype (Anstötz et al., 2015; Chittajallu et al., 2017). Whether different subtypes of *slm* neurons differentially distribute along the proximo-distal axis remains unknown. However, none of the *slm* neurons recorded here and *post hoc* morphologically analyzed displayed the anatomical characteristics of CR neurons whereas putative NGF cells were identified as postsynaptic targets for both VMT and EC inputs. Whether these include the two subtypes of NGF with differential embryonic origins remains to be determined (Overstreet-Wadiche and McBain, 2015). In any case, this identifies NGF cells as central nodes integrating these two major inputs onto the developing CA1. Interestingly, CA1 NGFs are also a major postsynaptic target of CR cells, an important player in CA1 circuit development (Quattrocolo and Maccaferri, 2014). In addition, NGFs were shown to be central in synchronizing interneuron networks using a combination of synaptic and electrical signaling (Overstreet-Wadiche and McBain, 2015; Zsiros et al., 2007). It is therefore possible that NGF neurons in the developing CA1 function in providing an unspecific and broad feedforward activation of local inhibitory circuits in response to extra-hippocampal inputs.

If the proximo-distal distribution of *slm* GABAergic neurons is unknown, less is true for their *stratum pyramidale* glutamatergic counterparts which are known to segregate along this axis according to their birthdate (Cossart and Khazipov, 2021). It is also known that CA1 pyramids, in the adult, are directly contacted by EC inputs, with cells located in deeper portions of the CA1 radial axis more likely to display direct contacts (Masurkar et al., 2017). Given that deep CA1 pyramids are older than superficial ones, these are likely to be more developed with a dendritic arborisation reaching the *slm* (Tyzio et al., 1999). Morphological analysis of the CA1 pyramids displaying evoked EPSCs following EC input photoactivation may indicate whether these share similar dendritic properties and soma location. If more than half of the recorded CA1 pyramids displayed EC-evoked EPSCs, almost none was directly stimulated by VMT photoactivation. The possibility that VMT evoked EPSCs would be undetected at the soma due to their distal origin is unlikely given that EC inputs are detected (despite a similar distal origin) and because of the inherent electrotonic compactness of immature neurons. Interestingly, the absence of direct VMT inputs onto most pyramids was also reported in the adult CA1 (Andrianova et al., 2021), indicating that this different innervation does not reflect a protracted maturation of VMT axons onto CA1 pyramids (even though VMT CA1 inputs arrive

three days later than EC inputs (Supèr and Soriano, 1994)). Whether the rare CA1 pyramids we found to be directly activated by VMT inputs in the developing CA1 reflect a transient developmental connection or reveal a rare subtype of CA1 pyramidal neuron remains to be further studied.

The differential anatomical and functional connectivity of EC and VMT inputs is reflected in the single-cell *in vivo* response to their chemogenetic inhibition. Of note, these single-cell responses were principally monitored in the *stratum pyramidale*, away from the initial site of VMT and EC input integration. As discussed above, EC inhibition results in a decrease in the fraction of active neurons involved in SCEs, an effect that is not observed when inhibiting the VMT, which only reduces the fraction of pyramidal cell calcium transients. The differential impact of VMT versus EC onto CA1 SCEs likely indicates the EC as the main relay station for sensorimotor inputs generated by spontaneous motor twitches (Karlsson et al., 2006; Rio-Bermudez and Blumberg, 2021; Valeeva et al., 2019) and is supported by a larger excitatory drive from EC onto CA1 principal cells. The lack of VMT modulation of interneuron activity in the CA1 *stratum pyramidale in vivo* contrasts with the generation of evoked polysynaptic GABAergic events and GDPs by activation of VMT inputs *ex vivo*. This may have several explanations, including the possible lack of direct synaptic inputs from CA1 *slm* interneurons and CA1 pyramids onto *sp* interneurons at these early stages (Dard et al., 2022). However, *ex vivo* experiments indicate that *slm* interneurons are rather well connected into local circuits since their optogenetic activation alone induces polysynaptic GABAergic responses in principal cells. Such ability to trigger synchrony through the selective activation of interneuron circuits may be related to the excitatory action of the transmitter in slices (Dzhala et al., 2012; Valeeva et al., 2016). The decrease of CA1 principal cell activity following VMT *in vivo* inhibition could also be explained by a direct excitatory GABAergic input, for example from NGF cells onto pyramids (but see (Murata and Colonnese, 2020)) or by a local disinhibitory circuit which remains to be elucidated.

In conclusion, our study shows how bottom-up inputs (transmitted from the EC) and higher order thalamic inputs (transmitting top-down information from the mPFC in the adult (Ferraris et al., 2021)), are differentially integrated within local intermediate to ventral CA1 circuits and modulate or even drive their early dynamics. If these inputs segregate between CA1 pyramids, they converge onto local *slm* GABAergic interneurons, including NGF cells of the *slm*. This is reminiscent of the developing neocortex, where layer 1 NGF neurons are first driven by bottom-up inputs, which in turn regulate the establishment of top-down connections from integrative areas (Che et al., 2018; Ibrahim et al., 2021). Whether similar mechanisms operate in the developing CA1 opens an interesting venue for research, this even more given

the role of the nucleus reuniens on developmental brain disorders implicating impaired cognitive functions (Cassel et al., 2021; Ferraris et al., 2021; Weel and Witter, 2020).

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by the European Research Council under the European Union's, Horizon 2020 research and innovation program Grant #646925 and #951330 (HOPE), the Fondation Bettencourt Schueller. E.L. was funded by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation", A*Midex foundation and the French National Research Agency funded by the French Government « Investissements d'Avenir » program (NeuroSchool, nEUro*AMU, ANR17-EURE-0029 grant), by the Fondation Bettencourt Schueller and is currently supported by ERC. R.F.D. was funded by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation", and currently by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant No. FDT202106012824). S.M. is funded by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation". C.F. is funded by ERC. M.B. was funded by the Fyssen Foundation, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant No. SPF20170938593), and by the European Union (Marie Skłodowska-Curie individual fellowship, grant No. 794861—IF-2017). We would like to thank V. Crepel and A. Represa for sharing equipment, F. Michel from the INMED imaging facility (InMagic) and INMED animal facility staff. We are grateful to M. Esclapez and A. de Chevigny for providing, respectively, the VGlut2-Cre and the Emx1-Cre mouse lines.

AUTHORS CONTRIBUTION:

EL, AB, and RC designed research. EL performed stereotaxic viral injection and RFD performed intraventricular viral injections. RFD performed surgery for *in vivo* 2-photon calcium imaging experiments and RFD, EL and MAP performed 2-photon calcium imaging acquisition. EL performed *ex vivo* 2-photon calcium imaging and patch-clamp recordings experiments. MB supervised *ex vivo* patch-clamp recording experiments. EL and RFD performed 2-photon calcium imaging analysis and EL performed *ex vivo* patch-clamp recordings analysis. SM and PPLS performed *in vivo* extracellular electrophysiological recordings and their analysis. CF, MG-K, AB, and EL performed histology experiments. EL, AB and CF performed histological analysis. RC and EL wrote the paper.

Figure 1

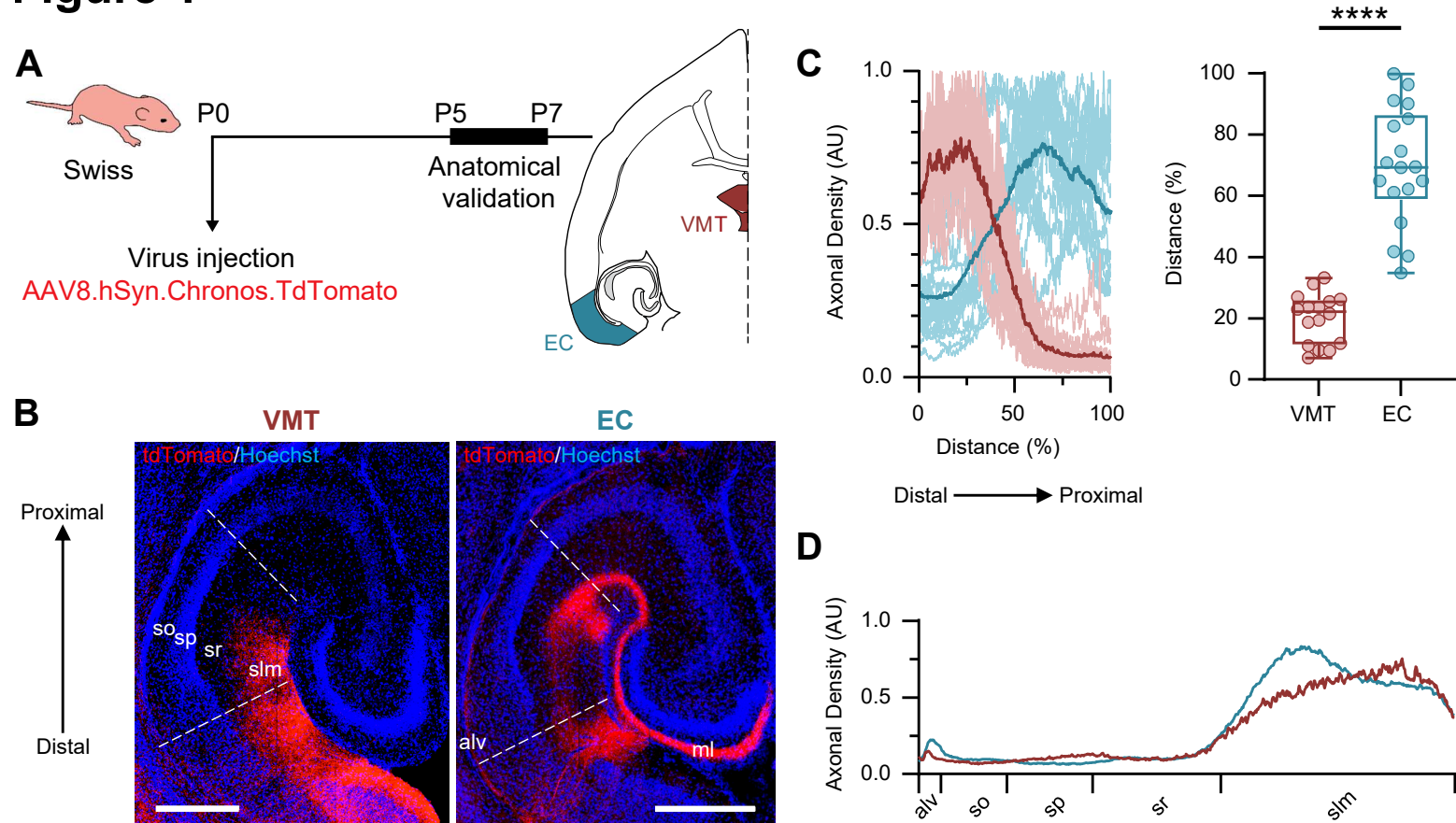


Figure 1. Anatomical segregation of thalamic and entorhinal inputs in the CA1 *slm* during development.

(A) Schematic representation of the experimental timeline.

(B) Confocal images of horizontal sections of the ventral part of P7 mice hippocampus showing the distribution of labeled fibers after tdTomato virus injection in the VMT (left) or EC (right). DAPI staining was used to define the different layers of CA1 region: *alveus* (*alv*), *stratum oriens* (*so*), *stratum pyramidale* (*sp*), *stratum radiatum* (*sr*) and the *stratum lacunosum moleculare* (*slm*). The dashed lines indicate the distal border, close to the subiculum, and the proximal border, close to CA2. VMT fibers were present in the CA1 *slm* while EC afferents were observed in the alveus, the CA1 *slm* and the molecular layer (ml) of the dentate gyrus. Scale bar: 400 μ m.

(C) Left: Distribution of VMT (red) and EC (blue) axon density in CA1 *slm* along the disto-proximal axis (0 to 100 %). Each light coloured curve represents the normalized measurement from an individual slice (VMT (red) : n=16 slices, N=4 animals, EC (blue) : n=18 slices, N=4 animals). Dark coloured curves correspond to the mean of all light curves. Right: Distance from the distal border of VMT and EC axonal density peaks. Each dot corresponds to the location from the distal border of the axonal intensity peak for a slice. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. Significant difference between VTM (n=16 slices, N=4 animals) and EC (n=18 slices, N=4 animals) was observed (Welch's t-test, $t=9.928$, $p<0.0001$).

(D) Mean distribution of VMT (red, n=16 slices, N=4 animals) and EC (blue, n=17 slices, N=4 animals) axon density in the CA1 radial axis.

Figure 2. VMT and EC inputs modulate *ex vivo* network activities in the developing CA1.

(A) Schematic representation of the experimental timeline. On the right, calcium transients (negative variation of dF/F in Fura2-AM) were observed during periods of non-stimulation and during the application of a stimulation train at 0.1 Hz or 0.2 Hz (blue). Scale bar: 50 μ m.

(B). Example of the effect of VMT afferences photostimulation on the CA1 network activity observed in a P5-P7 brain slice of a wild-type SWISS mouse pup, injected with Chronos/tdTomato in the VMT at P0. B1, Raster plots showing neuronal activity as a function of time. The light blue rectangle corresponds to the photostimulation period during which phasic stimulations at 0.1 or 0.2 Hz were applied (blue lines). B2, Measurement of the inter-GDP interval during the period of stimulation of VMT afferents (light blue) and non-stimulation corresponding to the raster plot shown in 1. Each dot corresponds to the measured IGIs during non-stimulation ("No-Stim") and stimulation ("Stim") periods. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. Significant difference between non-stimulation and stimulation periods was observed (No-Stim : median=27.84 s [iqr=66.71], n=10 IGIs, Stim : median=9.920 s [iqr=9.30], n=20 IGIs, Mann-Whitney, $U=3.0$, $p<0.0001$). B3, GDPs occurrence time with respect to the photostimulation during the stimulation period that correspond to the raster plot shown in 1. GDP occurrence (black rectangles) as a function of time following 0.1 Hz phasic stimulations of VMT afferents. Twenty consecutive light stimulations were centered to time 0 (blue line). The 20 stimulations were followed by GDPs in the following second (light blue rectangle, 99th percentile=17).

(C) Same as **(B)** but for Chronos/tdTomato injection in P0 wild-type SWISS mouse pups' entorhinal cortex. C1, Raster plots showing neuronal activity as a function of time. C2, For IGI, significant difference between non-stimulation and stimulation periods was observed (No-Stim : median=32.98 s [iqr=59.27], n=8 IGIs, Stim : median=9.920 s [iqr=6.696], n=20 IGIs, Mann-Whitney, $U=0.0$, $p<0.0001$). C3, The 20 stimulations triggered the GDPs in the following second (light blue rectangle, 99th percentile=16.5).

(D) Proportions of VMT, EC and Control (Ctrl; laser stimulation on slices without virus, see Figure S5C) displaying significant effects on GDP frequency and GDP synchronization upon stimulation. "Combined" corresponds to traces that show an effect on frequency and/or timing of the GDPs.

Figure 3

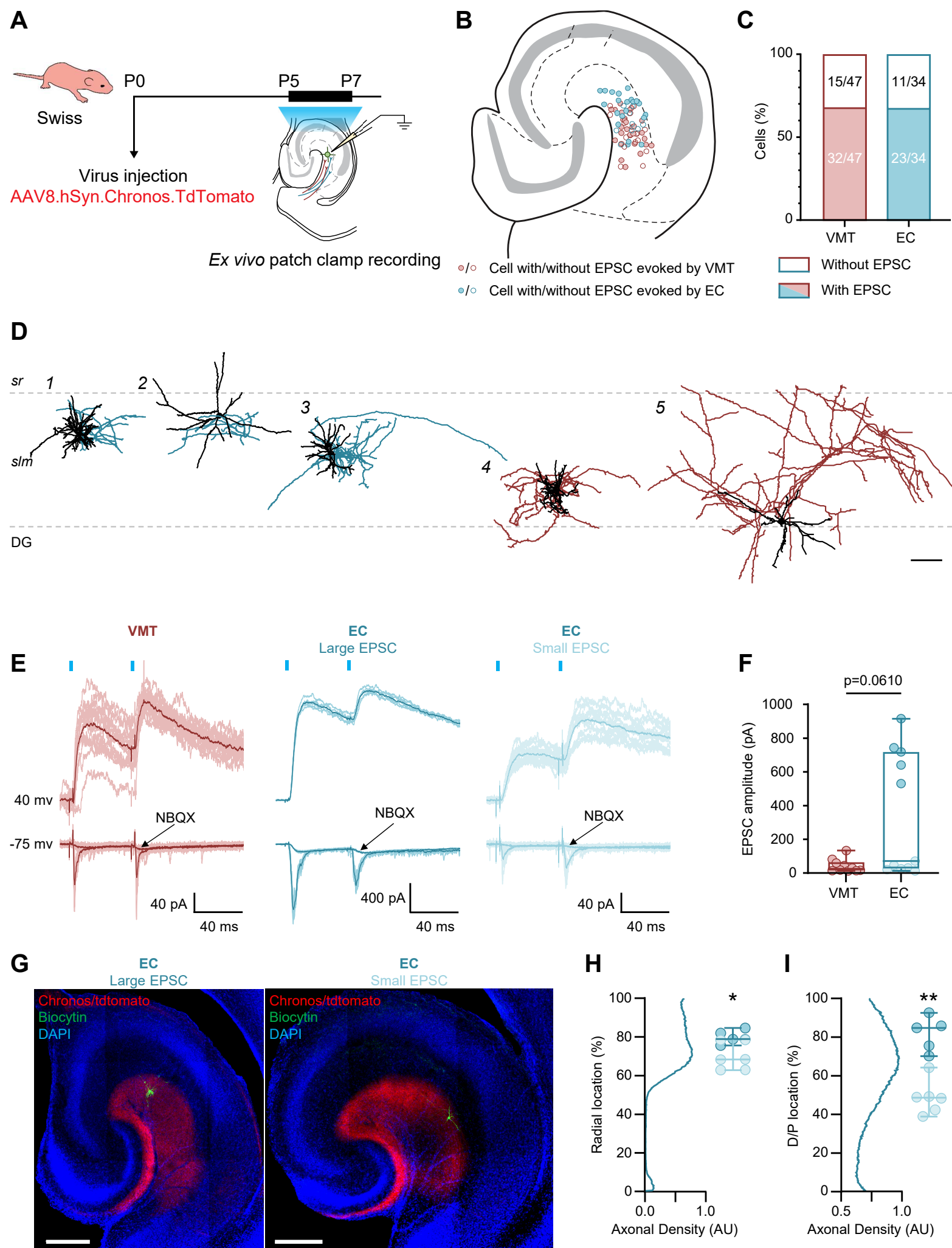


Figure 3. Recruitment of CA1 *slm* GABAergic neurons by VMT and EC inputs during the first postnatal week.

(A) Schematic representation of the experimental timeline.

(B) Position of patched CA1 *slm* GABAergic neurons on a schematic representation of the horizontal section of the ventral hippocampus (Adapted from (Franklin and Paxinos, 2007)). Filled dots correspond to responding cells to VMT (red) or EC (bleu) photostimulation. Empty dots correspond to no responding cells.

(C) Proportion of CA1 *slm* GABAergic cells displaying EPSCs upon stimulation of VMT (red, 68.09 %) and EC (blue, 67.65 %) afferents. Empty parts represent cells that didn't respond to the stimulation (VMT: 31.91 %, EC: 32.35 %). No significant difference between VTM (n=47 cells) and EC (n=34 cells) was observed.

(D) Neurolucida reconstructions of representative neurobiotin-filled *slm* GABAergic neurons. Axon is depicted in blue for EC-stimulated cells and in red for VMT-stimulated cells. Soma and dendrites are colored in black. Cells 1, 3 and 4 had a neurogliaform-like morphology (NGF) and cells 2 and 5 presented a no-neurogliaform-like morphology (*slm*INs). Scale bar: 100 μ m.

(E) From left to right, monosynaptic glutamatergic responses evoked by the VMT (red) and the EC (blue) LED photostimulation (two light pulses of 3 ms, blue lines). EC photostimulation evoked large EPSCs (middle) or small EPSCs (right). Photostimulations evoked AMPA responses, recorded at -75 mV and blocked with NBQX, and NMDA responses, recorded at +40 mV. The light traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark.

(F) EPSCs amplitude evoked by the photostimulation of VMT and EC inputs at -75 mV. Red filled dots correspond to cells responding to VMT photostimulation. Dark blue filled dots correspond to cells displaying large EPSCs whereas light blue filled dots correspond to cells displaying small EPSC to EC photostimulation. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. The median value of EPSC amplitude is smaller for VMT photo-activation (n=10 cells) than for EC photo-activation (n=11 cells; Mann-Whitney test, p=0.0610).

(G) Epifluorescence microscope images of patched CA1 *slm* GABAergic neuron (green) displaying large EPSCs (left) and small EPSCs (right) to the light stimulation of EC afferents (in red). Scale bars: 250 μ m.

(H) Radial location of patched CA1 *slm* GABAergic neuron displaying large EPSCs and small EPSCs. On the y-axis, 0 corresponds to the *alveus* surface. Dark blue filled dots correspond

to cells displaying large EPSCs whereas light blue filled dots correspond to cells displaying small EPSC to EC photostimulation. For each group, the 25th, 50th and 75th percentiles were represented with the same color code. The blue curve represents the average distribution of EC axonal density on the radial axis of CA1 measured on slices corresponding to the small and large EPSC (n=11 slices). Significant radial location difference between large EPSC (n=5 cells) and small EPSC (n=6 cells) was observed (Mann-Whitney, $U=2$, $p=0.0173$).

(I) Same as **(H)** but for disto-proximal location of patched CA1 *s/m* GABAergic neuron displaying large EPSCs and small EPSCs. On the y-axis, 0 corresponds to the distal border of CA1 *s/m*. The blue curve represents the average distribution of EC axonal density on the disto-proximal axis of CA1 *s/m* measured on slices corresponding to the small and large EPSC (n=11 slices). Significant disto-proximal location difference between large EPSC (n=5 cells) and small EPSC (n=6 cells) was observed (Mann-Whitney, $U=0$, $p=0.0043$).

Figure 4

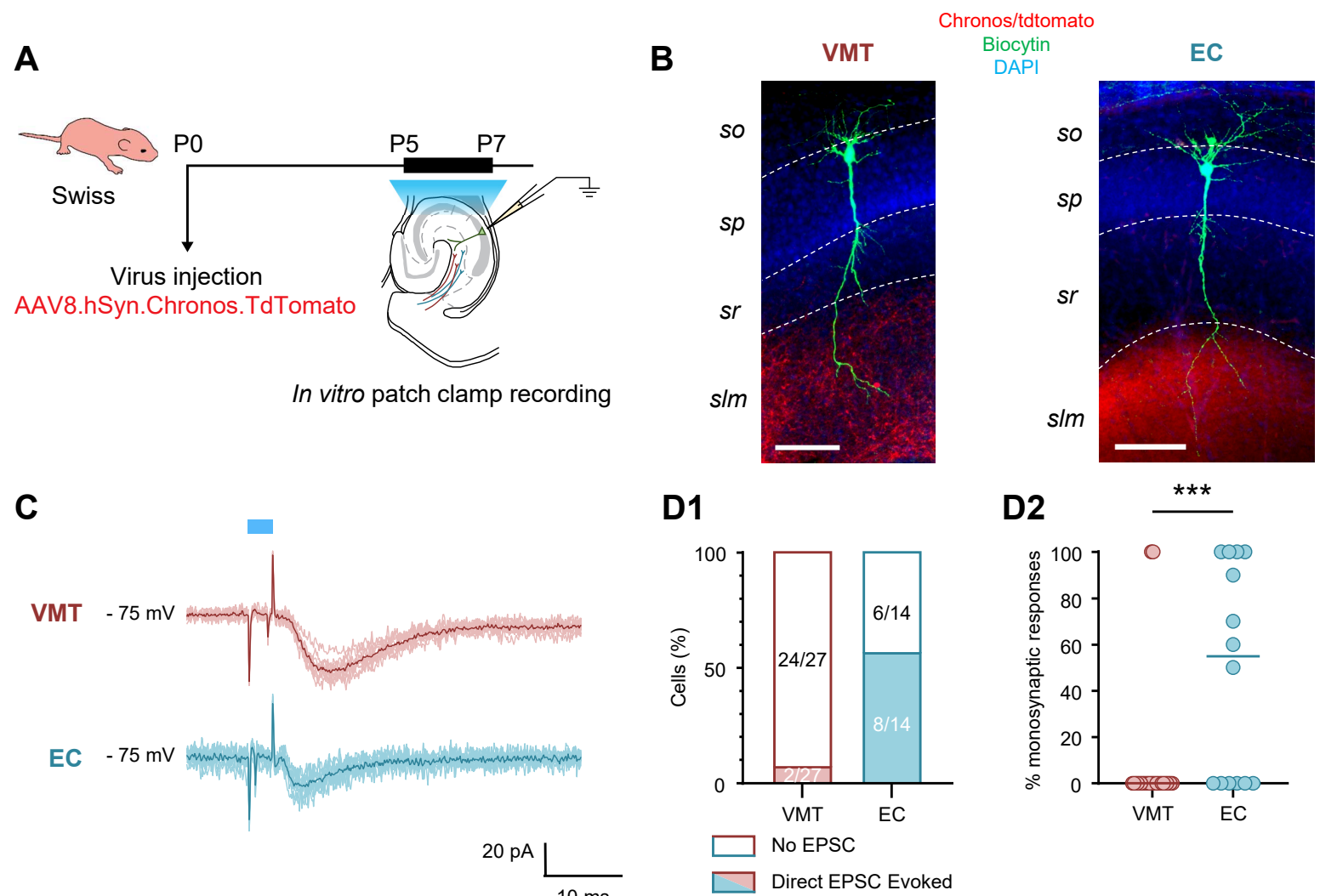


Figure 4. The entorhinal cortex directly recruits CA1 pyramidal neurons.

(A) Schematic representation of the experimental timeline.

(B) Dendrites of patched pyramidal neuron (green) reach the CA1 *slm*, where the VMT (left panel) and EC (right panel) axons expressing the Chronos/tdTomato project. Scale bars: 100 μ m.

(C) Monosynaptic glutamatergic responses evoked by VMT (top, red) and EC (bottom, blue) LED photostimulation (3 ms light pulse, blue line). The light traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark.

(D) D1, Proportion of CA1 pyramidal neurons displaying EPSCs upon stimulation of VMT (red, 7,41 %) and EC (blue, 57,14 %) afferents. Empty parts represent cells that did not respond to the stimulation (VMT: 92.59 %, EC : 42.86 %). Significant difference between VTM (n=27 cells) and EC (n=14 cells) was observed (Fisher's exact test, p=0.0010). D2, Percentage of monosynaptic responses evoked by VMT (red) and EC (blue) photostimulation on CA1 pyramidal cells. Each dot corresponds to a cell, lines represent the median. Significant difference between VTM (n=27 cells) and EC (n=14 cells) was observed (Mann-Whitney test, U=99, p=0.0010).

Figure 5

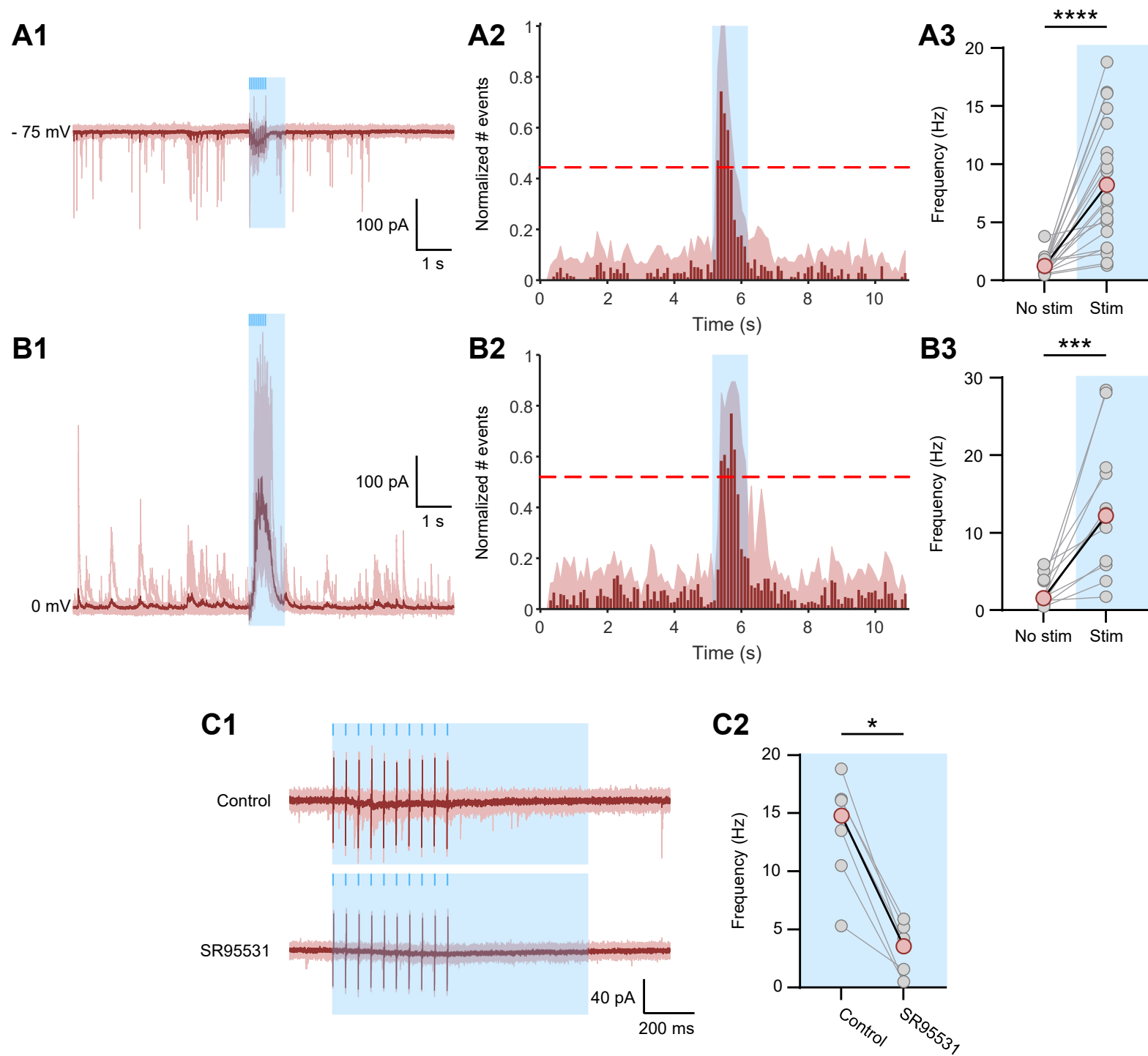


Figure 5. VMT inputs modulate CA1 pyramidal cells through a GABAergic network.

(A) A1, Spontaneous EPSCs recorded at -75 mV from a CA1 pyramidal cell interrupted by the application of a 10-light pulses train at 20 Hz (3 ms each light pulse, blue lines). The light red traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark red. The light blue rectangle corresponds to the second following the onset of the first light pulse, named stimulation period ("Stim"). The rest is the non-stimulation period ("No stim"). A2, The normalized number of EPSCs as a function of time represents, for each bin, the median value calculated from the recorded cells. For each cell, the number of EPSCs was summed within 100 ms bins and then normalized by the maximum number of EPSCs observed in a bin. The light red area represents the 75th percentiles for each 100 ms bin. The threshold, in red dotted line, represents the median of the thresholds for each bin, which corresponds to the median value of the 95th percentile calculated from 1000 surrogates. The light blue rectangle corresponds to the "Stim" period defined in 1. A3, EPSCs frequency measured during the No stim and Stim (light blue) periods. Each light gray dot represents a cell, the red dots correspond to the means. Paired comparisons between No stim and Stim periods were tested using the Paired t-test ($n=20$ cells, $t=5.795$, $p<0.0001$).

(B) Same as **(A)** but for IPSCs. B1, Recording performed at the glutamate reversal potential (0 mV). B2, The normalized number of IPSCs as a function of time was obtained as described in A2. B3, IPSCs frequency measured during the No stim and Stim (light blue) periods. Paired comparisons between No stim and Stim periods were tested using the Wilcoxon test ($n=12$ cells, $W=78.0$, $p=0.0005$).

(C) 1. EPSCs recorded during the Stim period (light blue rectangle) without (Control) and with GABA_AR blocker (SR95531). Stim period corresponds to that described in A1. The light red traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark red. 2. EPSCs frequency measured without (Ctrl) and with GABA_AR blocker (SR95531) during the Stim periods (light blue). Each light gray dot represents a cell, the red dots correspond to the means. Paired comparisons between Control and SR95531 periods were tested using the Wilcoxon test ($n=7$ cells, $W=-28.0$, $p=0.0156$).

Figure 6

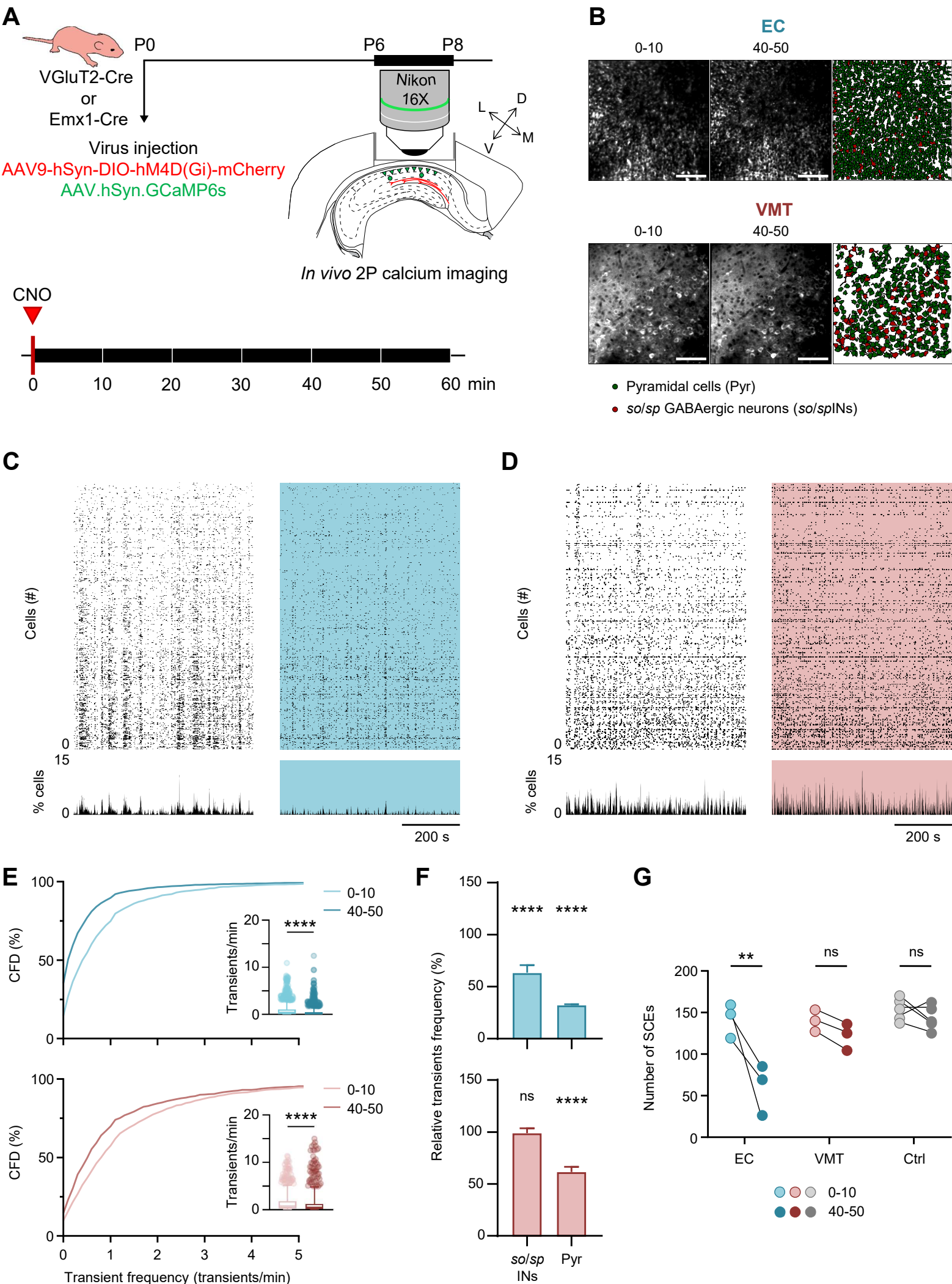


Figure 6. VMT or EC inhibition decreases CA1 network activity in vivo.

(A) Top: Schematic representation of the experimental timeline. Bottom: Timeline showing the imaging protocol sessions. Several ten-minutes imaging blocks were performed for one hour following the subcutaneous injection of CNO (10 mg/kg).

(B) FOV of the *stratum pyramidale* imaged during the 0-10 (left) and 40-50 (middle) periods from Emx1-Cre or VGluT2-Cre newborn mouse pups injected, respectively, in the EC or VMT with inhibitory DREADD virus. Scale bars = 100 μ m. On the right, the contour map of imaged neurons from the FOV. Inferred *so/sp* GABAergic neurons in red (*so/sp*INs), inferred pyramidal cells in green (Pyr).

(C) Raster plots showing neuronal activity as a function of time during the 0-10 (white) and 40-50 (light blue) periods of Emx1-Cre mouse pups injected in the EC with inhibitory DREADD virus. Graphs below represent the percentage of active cells as a function of time for both periods.

(D) Same as **(C)** but for DREADD injection in P0 VGluT2-Cre mouse pups' VMT (light red).

(E) Cumulative frequency distribution (CFD) plots of the transient frequency during the 0-10 and 40-50 periods for EC (top, n=2522 cells) or VMT (bottom, n=1115 cells) inhibition. The insets show the transient frequency for all cells during 0-10 (light) and 40-50 (dark) epochs. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. The transient frequency was significantly decreased from 40-50 minutes after CNO injection compared to the 0-10 epoch for both EC (Wilcoxon test, $W=-1691767$, $p<0.0001$; Kolmogorov-Smirnov test, $D=0.2387$, $p<0.0001$) and VMT inhibition (Wilcoxon test, $W=-186998$, $p<0.0001$; Kolmogorov-Smirnov test, $D=0.1632$, $p<0.0001$).

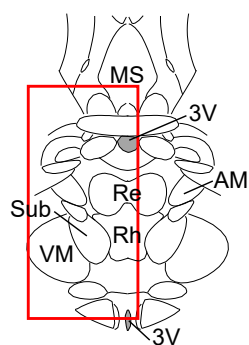
(F) Transients frequency measured during 40-50 period in *so/sp* GABAergic neurons (*so/sp*INs) and pyramidal cells (Pyr) normalized by 0-10 epoch transients frequency for EC (top) or VMT (bottom) inhibition. Each plot shows the 50th and 95th percentile. The median was significantly lower than 100 in *so/sp*INs (One sample Wilcoxon test, n=164 cells, theoretical median 100, $W=-8140$, $p<0.0001$) and Pyr (One sample Wilcoxon test, n=1992 cells, theoretical median 100, $W=-1342710$, $p<0.0001$) for EC inhibition, and significantly lower than 100 in Pyr for VMT inhibition (One sample Wilcoxon test, n=722 cells, theoretical median 100, $W=-111959$, $p<0.0001$).

(G) Number of SCEs measured during 0-10 and 40-50 epochs for EC (N=3 animals) or VMT (N=3 animals) inhibition and control conditions (N=5 animals). Significant difference between

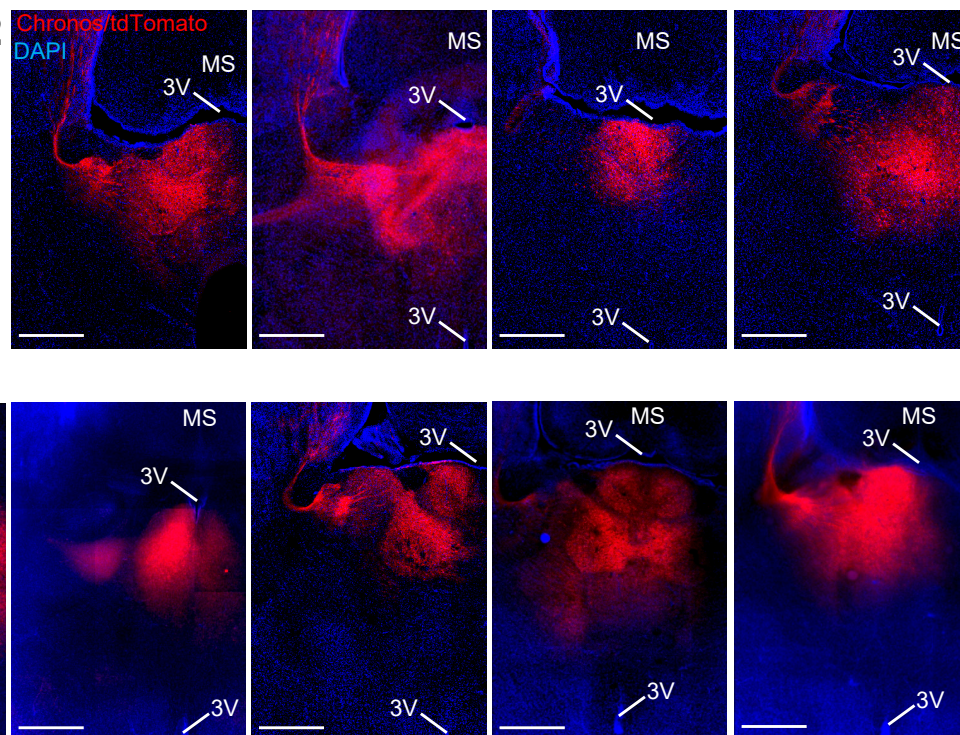
0-10 and 40-50 during EC inhibition was observed (2-way ANOVA followed by Šidák's multiple comparisons test, inputs-epochs interaction, $F(2,8)=7.403$, $p=0.0151$; inputs, $F(2,8)=14.32$, $p=0.0023$; epochs, $F(1,8)=19.84$, $p=0.0021$; epochs were different for EC inputs, $p=0.0021$).

Supplementary 1

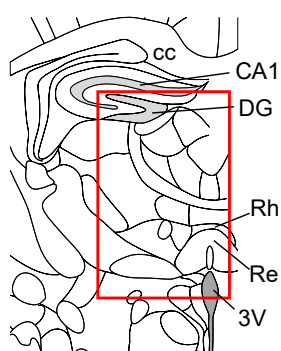
A1



A2



B1



B2

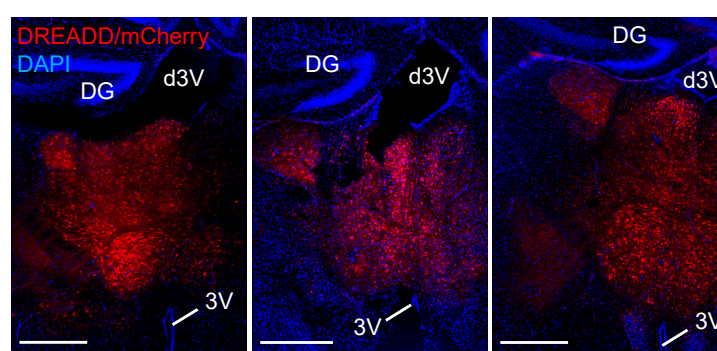


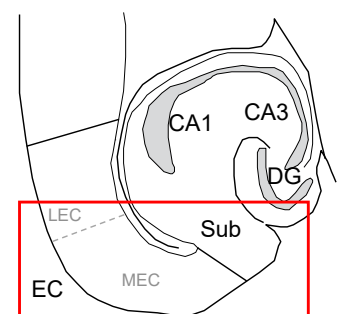
Figure S1. Examples of VMT injection sites.

(A) A1, Schematic representation of the ventral midline thalamus (VMT) from an horizontal slice adapted from (Franklin and Paxinos, 2007). The red rectangle corresponds to the area of the confocal images in Figure A2. A2, Examples of confocal or epifluorescence microscope images of P5-P7 brain horizontal sections from different wild-type SWISS mouse pups injected at P0 with Chronos/tdTomato virus in the VMT, composed by the reuniens nucleus (Re) and the rhomboid nucleus (Rh). Chronos/tdTomato virus was not expressed in the medial septum (MS). Scale bars: 500 μ m

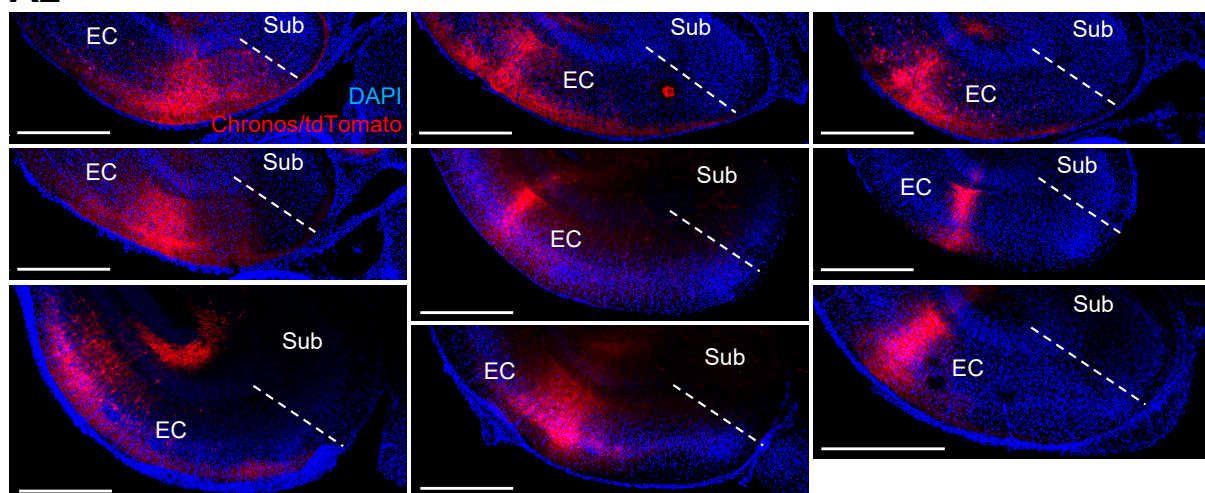
(B) B1, Schematic representation of the medial part of the thalamus from a coronal slice adapted from (Paxinos et al., 2020). The red rectangle corresponds to the area of the confocal images in Figure B2. B2, Confocal or epifluorescence microscope images of P6-P8 brain coronal sections from VGluT2-Cre mouse pups (N=3 animals) injected at P0 with DREADD/mCherry virus in the VMT. These animals correspond to the ones used during *in vivo* 2-photon calcium imaging experiments. Injection site is located between the 2 parts of the 3rd ventricle (3V). DREADD/mCherry virus was not expressed in the dentate gyrus of the hippocampus (DG). Scale bars: 500 μ m

Supplementary 2

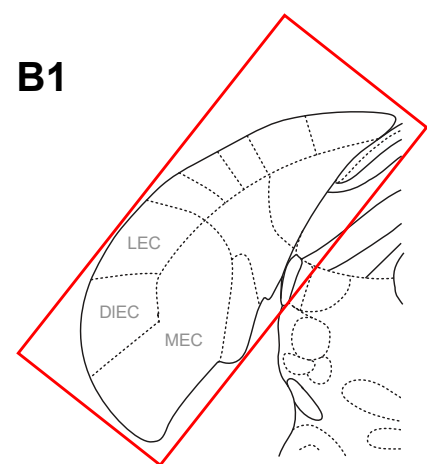
A1



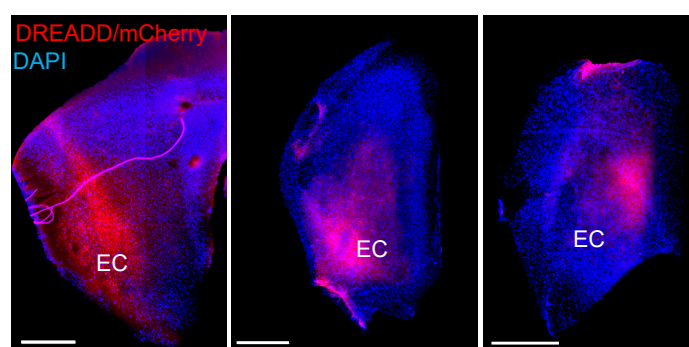
A2



B1



B2



C

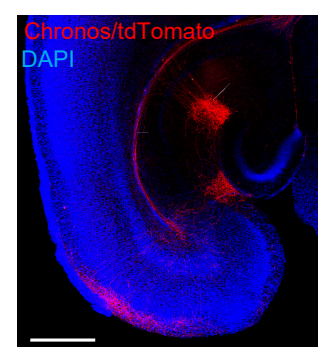


Figure S2. Examples of EC injection sites.

(A) A1, Schematic representation of the entorhinal cortex (EC) on an horizontal slice adapted from (Franklin and Paxinos, 2007). The red rectangle corresponds to the area of the confocal images in Figure A2. A2, Examples of confocal or epifluorescence microscope images of P5-P7 brain horizontal sections from different wild-type SWISS mouse pups injected at P0 with Chronos/tdTomato virus in the EC, composed by medial entorhinal cortex (MEC) and the lateral entorhinal cortex (LEC). Chronos/tdTomato virus was not expressed in the subiculum (Sub). Scale bars: 500 μ m

(B) B1, Schematic representation of the EC on a coronal slice adapted from (Paxinos et al., 2020). The red rectangle corresponds to the area of the confocal images in Figure B2. B2, Confocal or epifluorescence microscope images of P6-P8 brain coronal sections from Emx1-Cre mouse pups (N=3 animals) injected at P0 with DREADD/mCherry virus in the EC, composed by the MEC, the LEC and the dorsal intermediate entorhinal cortex (DIEC). These animals correspond to the ones used during *in vivo* 2-photon calcium imaging experiments. Scale bars: 500 μ m

(C) EC fibers expressing Chronos/tdTomato virus project to the contralateral hippocampus. EC fibers reached the contralateral hippocampus through the fimbria and then the alveus (arrow). Fibers are crossing radially CA1 region (arrowhead) to reach CA1 *s/m* (double arrowhead).

Supplementary 3

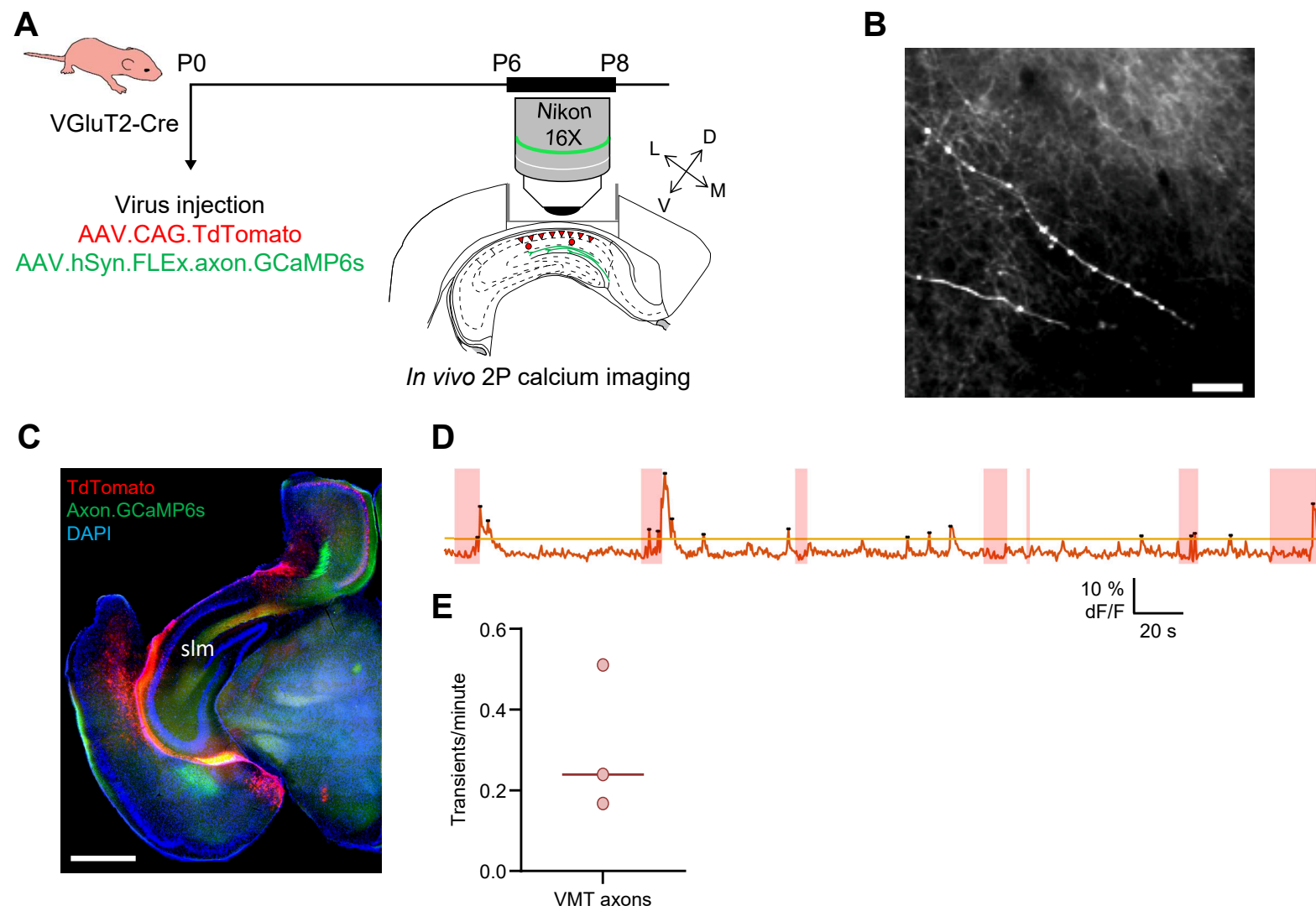


Figure S3. In vivo 2-photon calcium imaging of VMT axons in the CA1 *slm* at the end of the first postnatal week.

(A) Schematic representation of the experimental timeline.

(B) Averaged image from the imaged FOV in the CA1 *slm* of a VGluT2-Cre mouse injected with Cre-dependent axon-GCaMP6s virus at P0 in the VMT. Scale bars = 50 μ m.

(C) Coronal sections showing the location of the cannula and the glass window above the intermediate hippocampus. The VMT fibers (green) were present within the field of view (FOV) in the *slm* of CA1. Scale bars: 1 mm.

(D) Example of a denoised dF/F signal extracted from an active VMT axonal branch. Light red rectangles correspond to the z-movement periods. The threshold corresponds to the median of the free z-movements denoised trace plus 3 times its interquartile range. Black dots correspond to the significant peaks. Significant transients were conserved if their onset was out of a movement period.

(E) Distribution of the number of transients per minute measured from active VMT branches expressing GCaMP6s in P6-P8 mouse pups. Each dot corresponds to a FOV (n=3 FOV, N=2 animals), lines represent the median.

Supplementary 4

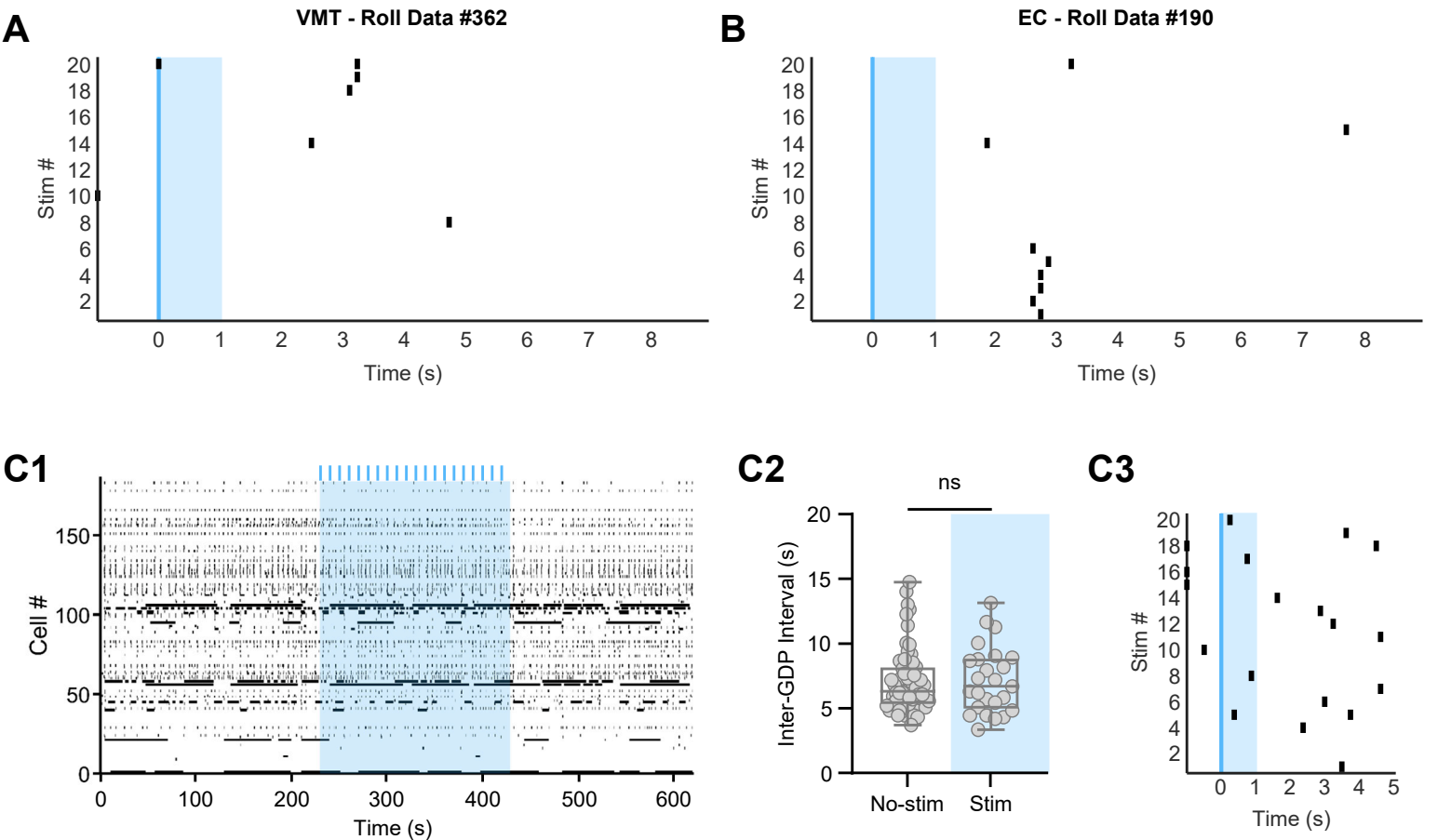


Figure S4. Control analysis and experiment for *ex vivo* 2-photon calcium imaging experiments.

(A) Example of a surrogate obtained by rolling the time stamp of the GDPs detected during the analysis of an *ex vivo* 2-photon calcium imaging movie to determine the threshold beyond which the association of GDPs with VMT stimulation exceeds the chance level in this movie.

(B) Same as **(A)** but for EC stimulation.

(C) Example of control (Ctrl) photostimulation effect on the network activity of developing CA1 observed in slice. The Ctrl experiment consisted of performing stimulation protocols on slices that didn't express opsin. C1, Raster plots showing neuronal activity as a function of time. The light blue rectangle corresponds to the photostimulation period during which phasic stimulations at 0.1 or 0.2 Hz were applied (blue lines). C2, Measurement of the inter-GDP interval during the period of photostimulation (light blue) and non-stimulation corresponding to the raster plot shown in 1. Each dot corresponds to the measured IGIs during non-stimulation ("No-Stim") and stimulation ("Stim") periods. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. No significant difference between. No-Stim and Stim periods was observed (No-Stim: median=6.324 s [iqr=11.04], n=59 IGIs, Stim : median=6.696 s [iqr=9.796], n=25 IGIs, Mann-Whitney, U=725.5, p=0.9091). C3, GDPs distribution during the stimulation period that correspond to the raster plot shown in 1. GDP occurrence (black rectangles) as a function of time following 0.1 Hz phasic Ctrl stimulations. Twenty consecutive light stimulations were centered to time 0 (blue line). Among them, 4 stimuli were followed by GDP in the following second (light blue rectangle, 99th percentile=6).

Table 1

Slices	0,1 Hz stimulation						
	IGI Stim vs No-Stim (ms)			Associated GDP			
	Stim	No stim	Statistical test	Stat	Associated GDPs	Threshold	Stat
20-02-16/2 (VMT)	6,200 (4,619 - 9,858)	9,052 (6,944 - 11,160)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p = 0,0048	19	10	p<0,01
20-02-16/3 (VMT)	5,509 (± 2,224)	6,209 (± 2,079)	Two-tailed Unpaired t test	ns	14	12	p<0,01
20-03-05/2 (VMT)	6,324 (5,239 - 8,091)	6,200 (5,146 - 8,618)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	6	7	ns
20-03-11/1 (VMT)	16,717 (± 7,656)	23,917 (± 9,376)	Two-tailed Unpaired t test	↘ : p = 0,0454	2	4	ns
20-03-13 (VMT)	3,844 (3,472 - 4,464)	3,720 (3,286 - 4,216)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	3	10	ns
20-06-13/1 (VMT)	8,381 (± 2,362)	8,980 (± 2,946)	Two-tailed Unpaired t test	ns	2	7	ns
20-06-14/1 (VMT)	9,920 (9,796 - 9,920)	27,838 (17,61 - 41,04)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p < 0,0001	20	17	p<0,01
20-08-18/1 (EC)	23,250 (9,176 - 27,28)	33,108 (23,100 - 51,000)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	2	2	ns
20-08-18/2 (EC)	9,920 (9,920 - 10,040)	32,984 (15,690 - 56,480)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p < 0,0001	20	16,5	p<0,01
20-08-18/3 (EC)	9,052 (7,936 - 13,270)	13,268 (8,928 - 25,170)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	1	4	ns
20-09-14/1 (EC)	11,590 (± 2,984)	9,902 (± 2,610)	Two-tailed Unpaired t test	↗ : p = 0,0432	2	4	ns
20-09-22/1 (EC)	9,920 (5,456 - 9,920)	6,324 (5,208 - 7,750)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	20	15	p<0,01
20-09-26/2 (EC)	5,187 (± 2,152)	5,282 (± 2,211)	Two-tailed Unpaired t test	ns	15	13	p<0,01
20-09-28/2 (EC)	4,092 (3,100 - 5,394)	3,844 (3,100 - 4,836)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	5	9	ns
20-06-11/1 (Ctrl)	4,650 (3,689 - 5,735)	5,084 (4,216 - 5,952)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	3	9	ns
20-06-11/2 (Ctrl)	10,401 (± 7,728)	13,260 (± 6,392)	Two-tailed Unpaired t test	ns	2	5	ns
20-06-11/3 (Ctrl)	5,208 (4,216 - 6,510)	4,712 (4,216 - 5,952)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	5	9,5	ns
20-06-12 (Ctrl)	6,696 (4,960 - 8,866)	6,324 (5,332 - 8,184)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	4	6	ns

Supplementary Table 1 (related to Figure 4). Effect of VMT, EC and Ctrl photostimulation at 0,1 Hz on the IGI and the GDP association to the stimulation. Upward pointing arrow means significant increase of IGI; downward pointing arrows mean decrease of IGI. The IGI values correspond to the median (25th percentile - 75th percentile) or the mean ($\pm$ SD).

Table 2

Slices	0,2 Hz stimulation						
	IGI Stim vs No-Stim (ms)				Associated GDP		
	Stim	No stim	Statistical test	Stat	Associated GDPs	Threshold	Stat
20-03-05/2 (VMT)	6,448 (5,084 - 7,564)	8,184 (6,820 - 11,28)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p < 0,0001	5	9	ns
20-03-13 (VMT)	4,216 (3,224 - 6,510)	3,472 (3,100 - 4,464)	Two-tailed Mann-Whitney	↗ : p = 0,0082	8	16	ns
20-06-13/1 (VMT)	10,478 (6,014 - 15,35)	9,052 (7,378 - 12,15)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	2	9	ns
20-06-14/1 (VMT)	4,960 (4,960 - 5,084)	13,888 (7,068 - 37,45)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p = 0,0005	24	23,5	p<0,01
20-06-15/1 (VMT)	4,836 (3,720 - 6,200)	4,526 (3,503 - 6,417)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	11	14	ns
20-08-18/1 (EC)	12,772 (8,928 - 41,660)	12,772 (5,332 - 71,050)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	5	4,5	p<0,01
20-08-18/2 (EC)	4,960 (4,960 - 5,084)	31,062 (10,230 - 39,800)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p < 0,0001	32	28,5	p<0,01
20-08-18/3 (EC)	8,060 (5,115 - 16,930)	20,212 (17,730 - 25,670)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p = 0,0031	3	6	ns
20-09-14/1 (EC)	10,168 (8,742 - 12,030)	10,106 (8,649 - 11,970)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	4	7	ns
20-09-22/1 (EC)	4,960 (4,960 - 4,960)	26,722 (12,68 - 45,04)	Two-tailed Mann-Whitney	↘ : p < 0,0001	40	37	p<0,01
20-09-26/2 (EC)	4,960 (4,836 - 5,084)	6,014 (3,410 - 8,773)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	37	33	p<0,01
20-09-28/2 (EC)	4,567 (± 1,640)	4,346 (± 1,544)	Two-tailed Unpaired t test	ns	10	16	ns
20-06-11/1 (Ctrl)	5,568 (± 1,804)	5,505 (± 2,351)	Two-tailed Unpaired t test	ns	12	12	ns
20-06-11/2 (Ctrl)	3,348 (1,364 - 13,890)	11,656 (2,046 - 16,740)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	8	8	ns
20-06-11/3 (Ctrl)	6,696 (5,270 - 8,742)	6,324 (5,084 - 8,370)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	7	14	ns
20-06-12 (Ctrl)	6,200 (4,774 - 9,858)	5,642 (4,805 - 7,471)	Two-tailed Mann-Whitney	ns	6	14	ns

Supplementary Table 2 (related to Figure 4). Effect of VMT, EC and Ctrl photostimulation at 0,2 Hz on the IGI and the GDP association to the stimulation. Upward pointing arrow means significant increase of IGI; downward pointing arrows mean decrease of IGI. The IGI values correspond to the median (25th percentile - 75th percentile) or the mean ($\pm$ SD).

Supplementary 5

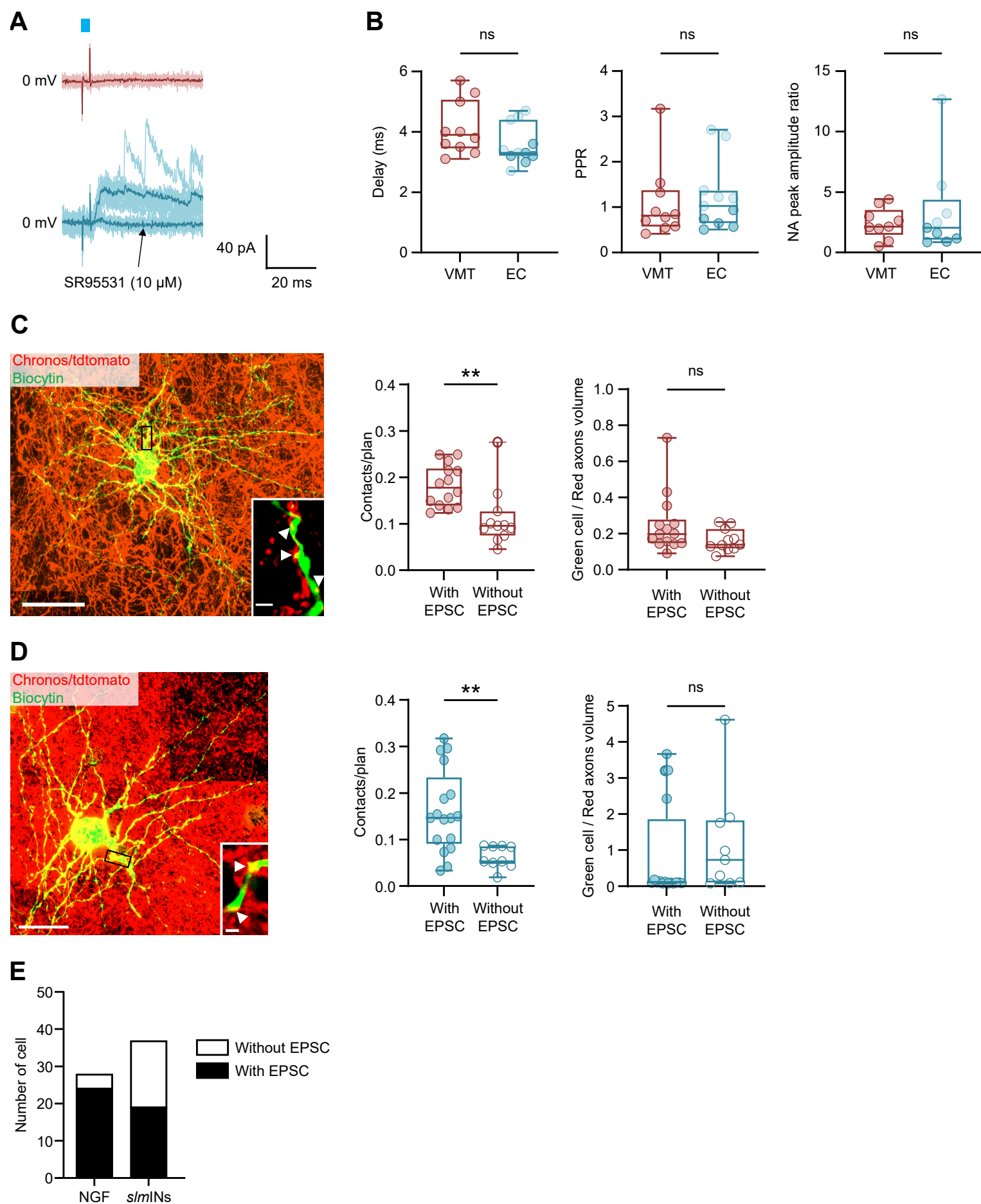


Figure S5. Supplementary electrophysiological and anatomical properties of patched CA1 *slm* GABAergic neurons.

(A) Monosynaptic GABAergic responses evoked on CA1 *slm* GABAergic neurons, at the EPSCs reversal potential (0 mV), by EC (bottom, blue) but not by VMT (top, red) LED photostimulation (3 ms light pulse, blue rectangle). The monosynaptic GABAergic responses evoked by EC photostimulation were blocked by GABA_AR inhibitor, SR95531. The light traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark.

(B) From the left to the right: delay, paired pulse ratio (PPR), and NMDA/AMPA (N/A) peak amplitude ratio measured on CA1 *slm* GABAergic neurons after photostimulation of VMT or EC inputs. PPR was measured by two 3-ms light pulses at 20 Hz. Red filled dots correspond to cells responding to VMT photostimulation. Dark blue filled dots correspond to cells displaying large EPSCs whereas light blue filled dots correspond to cells displaying small EPSC to EC photostimulation. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. No significant difference between VMT (n=10 cells) and EC (n=11 cells) was observed for the delay (Mann-Whitney test, U=31,50, p=0.1017) and the PPR (Mann-Whitney test, U=46, p=0.5573). No significant difference between VMT (n=9 cells) and EC (n=9 cells) was observed either for N/A peak amplitude ratio (Mann-Whitney test, U=39, p=0.9314).

(C) Left panel: representative maximum intensity projections of confocal z-stacks showing innervation of a patched CA1 *slm* GABAergic neuron by VMT afferents. Inset: single optical sections (thickness 0.4 μ m) showing magnifications of contacts (arrow heads) between a patched neuron dendrite (green) and fibers from the VMT (red). Scale bars: 20 μ m for the principal image; 2 μ m for the insert. Middle panel: Putative contacts number per plan between patch CA1 *slm* GABAergic neurons and VMT axons. Filled dots correspond to responding cells and empty dots correspond to no-responding cells. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. Significant difference between responding cells ("With EPSC", n=14 cells) and no-responding cells ("Without EPSC", n=11 cells) was observed (Mann-Whitney, U=21, p=0.0014). Right panel: Patched cell volume / VMT axons volume ratio compared between responding cells (With EPSCs) and no responding cells (Without EPSCs). Filled dots correspond to responding cells and empty dots correspond to no-responding cells. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. No significant difference between responding cells (With EPSC, n=14 cells) and no-responding cells (Without EPSC, n=11 cells) was observed (Mann-Whitney, U=46, p=0.0954).

(D) Same as **(C)** but for Chronos/*tdTomato* injection in P0 SWISS mouse pups' entorhinal cortex. Scale bars: 20 μm for the principal image; 2 μm for the insert. Significant difference between responding cells ("With EPSC", $n=17$ cells) and no-responding cells ("Without EPSC", $n=9$ cells) was observed for the number of contacts (Mann-Whitney, $U=24$, $p=0.0035$). No significant difference between responding cells (With EPSC, $n=16$ cells) and no-responding cells (Without EPSC, $n=9$ cells) was observed for the patched cell volume / EC axons volume ratio (Mann-Whitney, $U=53$, $p=0.3014$).

(E) Proportion of putative neurogliaform-like (NGF) and non-neurogliaform-like (*slmINs*) cells that received or not monosynaptic contacts from the VMT and the EC fibers present in the CA1 *slm*. The proportion of NGF responding to the photostimulation was significantly greater than that of *slmINs* (NGF: $n=28$ cells, With EPSC=85.71 %, Without EPSC=14.29 %; *slmINs*: $n=37$ cells, With EPSC=51.35 %, Without EPSC=48.65 %; Fisher's exact test, $p=0.0042$).

Supplementary 6

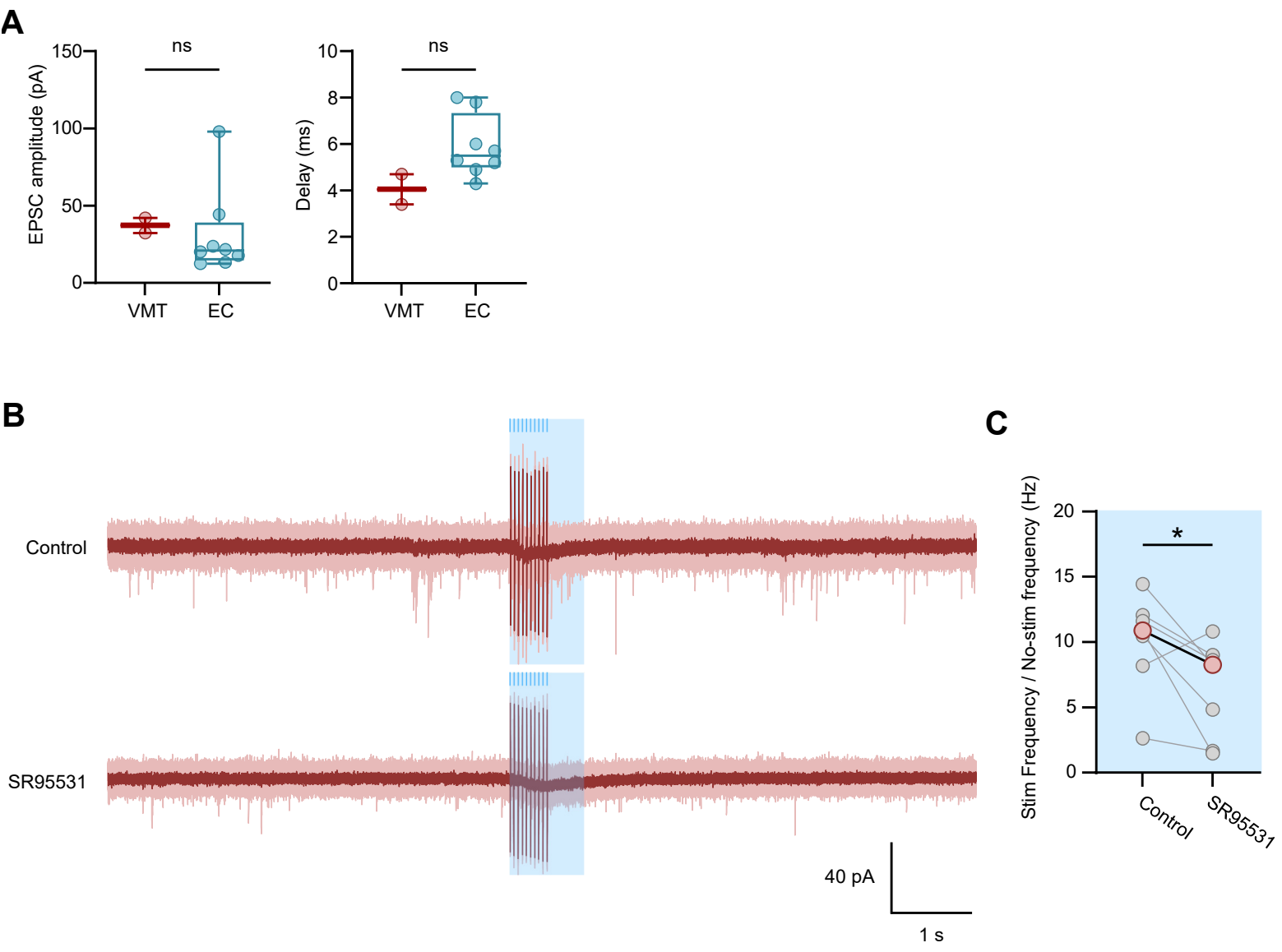


Figure S6. Supplementary electrophysiological properties of patched CA1 pyramidal neurons during stimulation of the VMT inputs.

(A) From the left to the right: Amplitude and delay measured on CA1 pyramidal neurons that respond to the photostimulation of VMT or EC inputs. Red filled dots correspond to cells responding to VMT photostimulation and blue filled dots correspond to EC photostimulation. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile.

(B) Top panel: Spontaneous EPSCs recorded without drug at -75 mV from a CA1 pyramidal cell interrupted by the application of a 10-light pulses train at 20 Hz (3 ms each light pulse, blue lines). The light red traces correspond to the sweeps and the average trace is shown in dark red. The light blue rectangle corresponds to the second following the onset of the first light pulse, named stimulation period ("Stim"). The rest is the non-stimulation period ("No stim"). Bottom panel: Same as the top panel but after application of the GABA_AR blocker SR95531.

(C) Stimulation period EPSCs frequency normalized by the no-stimulation period EPSCs frequency measured without (Ctrl) and with GABA_AR blocker (SR95531). Each light grey dot represents a cell, the red dots correspond to the means. Paired comparisons between Control and SR95531 periods were tested using the Wilcoxon test (n=7 cells, W=-24.0, p=0.0469).

Supplementary 7

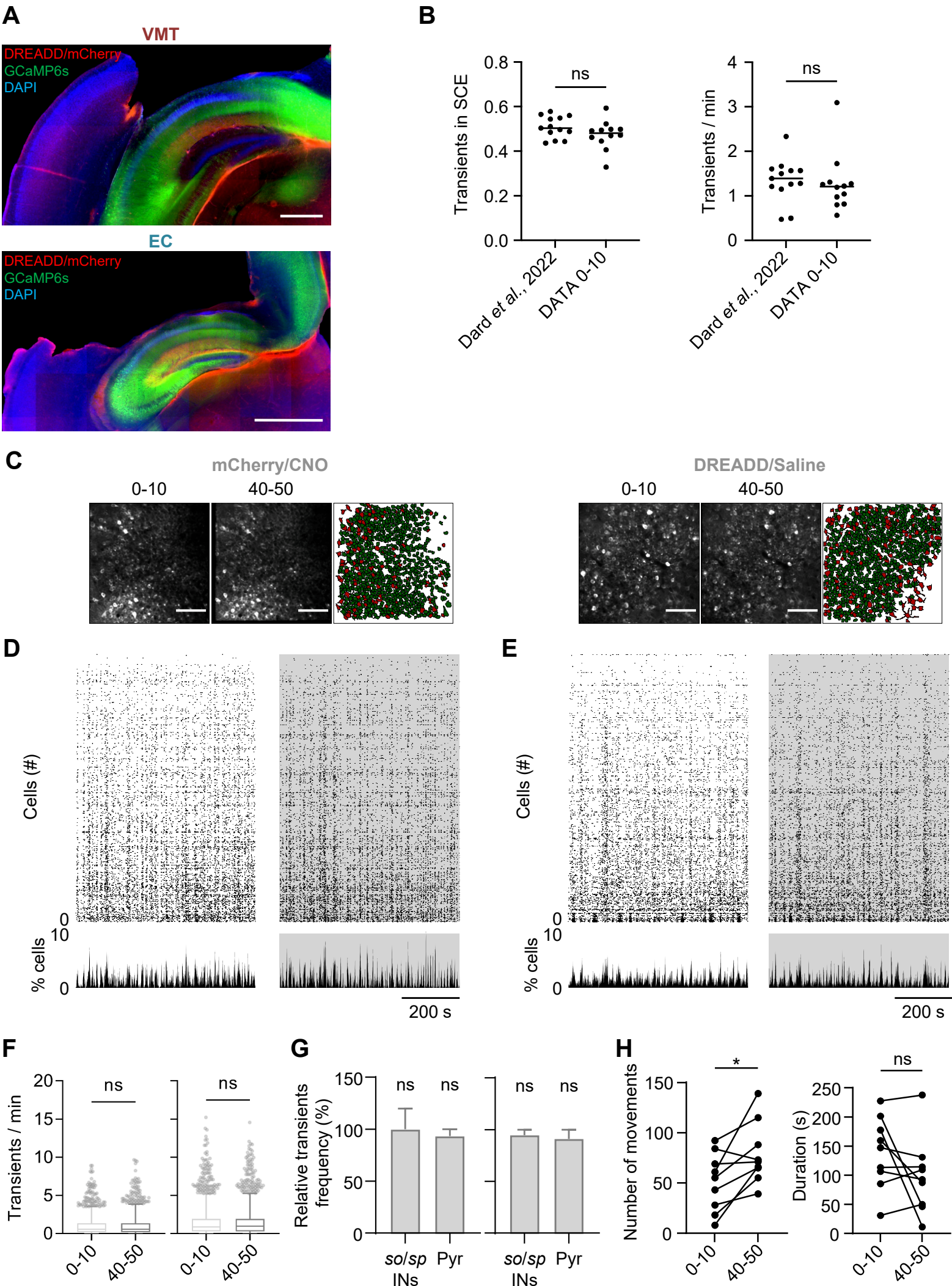


Figure S7. Controls for *in vivo* inhibition experiments with the DREADD receptor

(A) Coronal sections showing the location of the cannula and the glass window above the intermediate hippocampus. The VMT (top) and EC (bottom) fibers, in red, were also present under the field of view (FOV) in the *s/m* of CA1. Scale bars: 500 μ m.

(B) The ratio of calcium transients within SCEs over the total number of transients (left panel) and transient frequency (right panel), measured in P6-P8 mouse pups during the 0-10 epoch (N=12 animals), were compared with those described in a previous study (N=13 animals (Dard et al., 2022)). Each dot represents one animal and the black line corresponds to the median. No difference was observed for the transient in SCEs ratio (Mann-Whitney test, $U=55$, $p=0.2254$) and for the transient frequency (Mann-Whitney test, $U=57$, $p=0.2701$).

(C) FOV of the *stratum pyramidale* imaged during the 0-10 (left) and 40-50 (middle) periods from Emx1-Cre or VGluT2-Cre newborn mouse pups injected in the EC or VMT with mCherry or inhibitory DREADD virus. Scale bars = 100 μ m. On the right, the contour map of imaged neurons from the FOV. Inferred *so/sp* GABAergic neurons in red (*so/spINs*), inferred pyramidal cells in green (Pyr).

(D) Raster plots showing neuronal activity as a function of time during the 0-10 (white) and 40-50 (light gray) periods of a newborn mouse pup injected with inhibitory mCherry virus. Graphs below represent the percentage of active cells as a function of time for both periods.

(E) Same as **(D)** for animal stereotactically injected at P0 with DREADD and subcutaneously with saline solution during calcium imaging experiment.

(F) Cell transient frequency of mCherry/CNO ($n=1615$ cells, $N=2$ animals, left panel) and DREADD/Saline ($n=2032$ cells, $N=3$ animals, right panel) controls during 0-10 (light gray) and 40-50 (dark gray) epochs. Each boxplot shows the 25th, 50th and 75th percentiles and whiskers represent the 5th to the 95th percentile. The transient frequency was not different between the 0-10 and the 40-50 epochs for both mCherry/CNO (0-10: median=0.57 transient/min [iqr=8.90]; 40-50: median=0.57 transient/min [iqr=9.67]; Wilcoxon test, $W=-48137$, $p=0.1650$) and DREADD/Saline (0-10: median=0.86 transient/min [iqr=15.22]; 40-50: median=0.96 transient/min [iqr=14.54]; Wilcoxon test, $W=6717$, $p=0.8923$).

(G) Transients frequency measured during 40-50 period in *so/sp* GABAergic neurons (*so/spINs*) and pyramidal cells (Pyr) normalized by 0-10 epoch transients frequency for mCherry/CNO (left) or DREADD/Saline (right) mice. Each plot shows the 50th and 95th percentile. For the mCherry/CNO, the median was not different from 100 for both *so/spINs*

(n=126 cells, median=100 % [iqr=1300], One sample Wilcoxon test, theoretical median 100, W=1233, p=0.1338) and Pyr (n=1299 cells, median=93.32 % [iqr=1500], One sample Wilcoxon test, theoretical median 100, W=-35702, p=0.1868). Similarly, for DREADD/Saline condition, there was no difference for both *so/splNs* (n=282 cells, median=94.85 % [iqr=5000], One sample Wilcoxon test, theoretical median 100, W=2601, p=0.3429) and Pyr (n=1498 cells, median=91.22 % [iqr=4000], One sample Wilcoxon test, theoretical median 100, W=30869, p=0.3567).

(H) Animal behavior (number of movements, left panel; total movements duration, right panel; N= 9 animals) during the 0-10 and 40-50 epochs. Each black dot represents one animal. The number of movements was significantly different between 0-10 and 40-50 epochs (0-10: median= 55 movements [iqr=84]; 40-50: median= 71 movements [iqr=100]; Wilcoxon test, W=40, p=0.0156). The total movements duration was not different between 0-10 and 40-50 epochs (0-10: median=147.2 s [iqr=196.5]; 40-50: median=92.8 s [iqr=226.4]; Wilcoxon test, W=-17, p=0.3594).

Supplementary 8

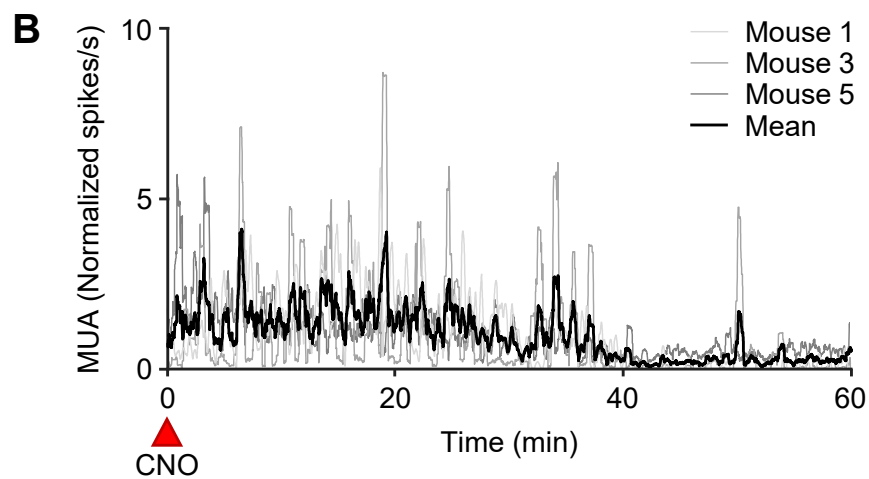
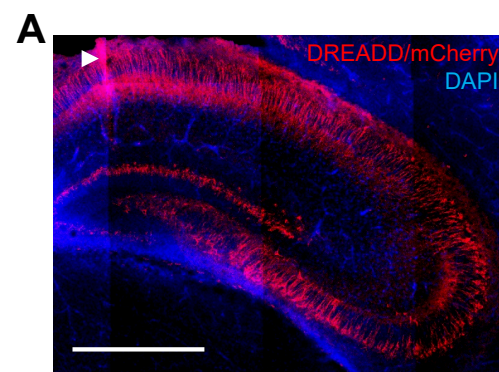


Figure S8. Control of CNO action time during *in vivo* extracellular electrophysiological recordings in mouse pups.

(A) Example of an epifluorescence microscopy image of coronal slices of a P6-P8 brain of Emx1-Cre mice injected at P0 with DREADD/mCherry virus in the hippocampus, recorded with a silicon probe. The arrowhead shows the recording site of the probe stained with Dil. Scale bars: 500 μ m.

(B) Normalized CA1 multi-unit activity (MUA) of P6-P8 Emx1-Cre mouse pups injected in the hippocampus with the inhibitory DREADD virus, recorded for 1 hour following the subcutaneous injection of CNO. Each gray line represents an animal (n=3 animals), the dark line corresponds to the mean.

Supplementary Movie 1. Light-sheet z-stack of a transparasised brain from an Emx1-Cre mouse pup injected with Chronos/tdTomato virus in the EC.

Supplementary Movie 2. Light-sheet z-stack of a transparasised brain from a VGluT2-Cre mouse pup injected with Chronos/tdTomato virus in the VMT.

Supplementary Movie 3. Example of an *ex vivo* calcium imaging movie from a P6 hippocampal slice from a wild-type mouse pup, injected with Chronos/tdTomato virus in the VMT at P0. The white frames correspond to the light stimulation. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

Supplementary Movie 4. Example of an *ex vivo* calcium imaging movie from a P6 hippocampal slice from a wild-type mouse pup, injected with Chronos/tdTomato virus in the EC at P0. The white frames correspond to the light stimulation. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

Supplementary Movie 5. Example of *in vivo* calcium imaging movies from P7 Emx1-Cre mouse pups injected with an inhibitory DREADD virus in the EC at P0. The left and the right parts correspond, respectively, to the first ten minutes (0-10) and the fortieth to fiftieth minutes (40-50) after CNO injection. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

Supplementary Movie 6. Example of *in vivo* calcium imaging movies from P8 VGluT2-Cre mouse pups injected with an inhibitory DREADD virus in the VMT at P0. The left and the right parts correspond, respectively, to the first ten minutes (0-10) and the fortieth to fiftieth minutes (40-50) after CNO injection. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

Supplementary Movie 7. Example of *in vivo* calcium imaging movies from a control P7 VGluT2-Cre mouse pups injected with an inhibitory DREADD virus in the VMT at P0. The left and the right parts correspond, respectively, to the ten first minutes (0-10) and the fortieth to fiftieth minutes (40-50) after saline injection. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

Supplementary Movie 8. Example of *in vivo* calcium imaging movies from a control P7 VGluT2-Cre mouse pups injected with a mCherry virus in the VMT at P0. The left and the right parts correspond, respectively, to the ten first minutes (0-10) and the fortieth to fiftieth minutes (40-50) after CNO injection. The movie was sped up to ten times the acquisition rate.

REFERENCES

- 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. *Journal of Neuroscience* 28, 12851–12863. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3733-08.2008>.
- Andrianova, L., Brady, E.S., Margetts-Smith, G., Kohli, S., McBain, C.J., and Craig, M.T. (2021). Hippocampal CA1 pyramidal cells do not receive monosynaptic input from thalamic nucleus reuniens. *Biorxiv* 2021.09.30.462517. <https://doi.org/10.1101/2021.09.30.462517>.
- Anstötz, M., Huang, H., Marchionni, I., Haumann, I., Maccaferri, G., and Lübke, J.H.R. (2015). Developmental Profile, Morphology, and Synaptic Connectivity of Cajal–Retzius Cells in the Postnatal Mouse Hippocampus. *Cerebral Cortex* 18, bhv271-18. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv271>.
- Basu, J., Zaremba, J.D., Cheung, S.K., Hitti, F.L., Zemelman, B.V., Losonczy, A., and Siegelbaum, S.A. (2016). Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science* 351, aaa5694–aaa5694. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5694>.
- Bayer, S.A. (1980). Development of the Hippocampal Region in the Rat I. Neurogenesis Examined With 3H-Thymidine Autoradiograph. *The Journal of Comparative Neurology* 190, 87–114.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 416, 303–325.
- Blankenship, A.G., and Feller, M.B. (2009). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrn2759>.
- Bocchio, M., Gouny, C., Angulo-Garcia, D., Toulat, T., Tressard, T., Quiroli, E., Baude, A., and Cossart, R. (2020). Hippocampal hub neurons maintain distinct connectivity throughout their lifetime. *Nature Communications* 11, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18432-6>.
- Bokor, H., Csáki, Á., Kocsis, K., and Kiss, J. (2002). Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci* 16, 1227–1239. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02189.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1175509>.
- Broussard, G.J., Liang, Y., Fridman, M., Unger, E.K., Meng, G., Xiao, X., Ji, N., Petreanu, L., and Tian, L. (2018). In vivo measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging. *Nat Neurosci* 21, 1272–1280. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0211-4>.
- Cassel, J.-C., Ferraris, M., Quilichini, P., Cholvin, T., Boch, L., Stephan, A., and Vasconcelos, A.P. de (2021). The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: a crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci Biobehav Rev* 126, 338–360. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>.
- Che, A., Babij, R., Iannone, A.F., Fetcho, R.N., Ferrer, M., Liston, C., Fishell, G., and García, N.V.D.M. (2018). Layer I Interneurons Sharpen Sensory Maps during Neonatal Development. *Neuron* 99, 98-116.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.002>.

- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Chittajallu, R., Wester, J.C., Craig, M.T., Barksdale, E., Yuan, X.Q., Akgül, G., Fang, C., Collins, D., Hunt, S., Pelkey, K.A., et al. (2017). Afferent specific role of NMDA receptors for the circuit integration of hippocampal neurogliaform cells. *Nature Communications* 8, 152. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00218-y>.
- Cossart, R., and Garel, S. (2022). Step by step: cells with multiple functions in cortical circuit assembly. *Nat Rev Neurosci* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00585-6>.
- Cossart, R., and Khazipov, R. (2021). How development sculpts hippocampal circuits and function. *Physiol Rev* <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2020>.
- Crépel, 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.007>.
- Dard, R.F., Leprince, E., Denis, J., Rao-Balappa, S., Suchkov, D., Boyce, R., Lopez, C., Giorgi-Kurz, M., Szwagier, T., Dumont, T., et al. (2022). The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion. *Biorxiv* 2021.06.08.447542. <https://doi.org/10.1101/2021.06.08.447542>.
- Denis, J., Dard, R.F., Quiroli, E., Cossart, R., and Picardo, M.A. (2020). DeepCINAC: A Deep-Learning-Based Python Toolbox for Inferring Calcium Imaging Neuronal Activity Based on Movie Visualization. *Eneuro* 7, ENEURO.0038-20.2020. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0038-20.2020>.
- Donato, F., Jacobsen, R.I., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2017). Stellate cells drive maturation of the entorhinal-hippocampal circuit. *Science* eaai8178-17. <https://doi.org/10.1126/science.aai8178>.
- Dzhala, V., Valeeva, G., Glykys, J., Khazipov, R., and Staley, K. (2012). Traumatic Alterations in GABA Signaling Disrupt Hippocampal Network Activity in the Developing Brain. *Journal of Neuroscience* 32, 4017–4031. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5139-11.2012>.
- Ferraris, M., Cassel, J.-C., Vasconcelos, A.P. de, Stephan, A., and Quilichini, P.P. (2021). The Nucleus Reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 125, 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.025>.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edition.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical Excitatory Neurons and Glia, But Not GABAergic Neurons, Are Produced in the Emx1-Expressing Lineage. *J Neurosci* 22, 6309–6314. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15-06309.2002>.
- Hartung, H., Brockmann, M.D., Pöschel, B., Feo, V.D., and Hanganu-Opatz, I.L. (2016). Thalamic and Entorhinal Network Activity Differently Modulates the Functional Development of Prefrontal-Hippocampal Interactions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36, 3676–3690. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3232-15.2016>.
- Hoover, W.B., and Vertes, R.P. (2012). Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217, 191–209.

<https://doi.org/10.1007/s00429-011-0345-6>.

Ibrahim, L.A., Huang, S., Fernandez-Otero, M., Sherer, M., Qiu, Y., Vemuri, S., Xu, Q., Machold, R., Pouchelon, G., Rudy, B., et al. (2021). Bottom-up inputs are required for establishment of top-down connectivity onto cortical layer 1 neurogliaform cells. *Neuron* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.004>.

Karlsson, K.A.E., Mohs, E.J., Prisco, G.V. di, and Blumberg, M.S. (2006). On the co-occurrence of startles and hippocampal sharp waves in newborn rats. *Hippocampus* 16, 959–965. <https://doi.org/10.1002/hipo.20224>.

Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., and Burwell, R.D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697–708. <https://doi.org/10.1002/hipo.20315>.

Kim, J.-Y., Grunke, S.D., Levites, Y., Golde, T.E., and Jankowsky, J.L. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J Vis Exp* 51863. <https://doi.org/10.3791/51863>.

Klapoetke, N.C., Murata, Y., Kim, S.S., Pulver, S.R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y.K., Morimoto, T.K., Chuong, A.S., Carpenter, E.J., Tian, Z., et al. (2014). Independent Optical Excitation of Distinct Neural Populations. *Nat Methods* 11, 338–346. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>.

Krashes, M.J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S.C., Adams, A.C., Cusher, D.S., Maratos-Flier, E., Roth, B.L., and Lowell, B.B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* 121, 1424–1428. <https://doi.org/10.1172/jci46229>.

Luhmann, H.J., and Khazipov, R. (2017). Neuronal activity patterns in the developing barrel cortex. *Neuroscience* 368, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.025>.

Marques-Smith, A., Lyngholm, D., Kaufmann, A.-K., Stacey, J.A., Hoerder-Suabedissen, A., Becker, E.B.E., Wilson, M.C., Molnár, Z., and Butt, S.J.B. (2016). A Transient Translaminar GABAergic Interneuron Circuit Connects Thalamocortical Recipient Layers in Neonatal Somatosensory Cortex. *Neuron* 89, 536–549. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.015>.

Martini, F.J., Guillaumon-Vivancos, T., Moreno-Juan, V., Valdeolmillos, M., and López-Bendito, G. (2021). Spontaneous activity in developing thalamic and cortical sensory networks. *Neuron* 109, 2519–2534. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.026>.

Masurkar, A.V., Srinivas, K.V., Brann, D.H., Warren, R., Lowes, D.C., and Siegelbaum, S.A. (2017). Medial and Lateral Entorhinal Cortex Differentially Excite Deep versus Superficial CA1 Pyramidal Neurons. *CellReports* 18, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.012>.

Masurkar, A.V., Tian, C., Warren, R., Reyes, I., Lowes, D.C., Brann, D.H., and Siegelbaum, S.A. (2020). Postsynaptic integrative properties of dorsal CA1 pyramidal neuron subpopulations. *Journal of Neurophysiology* 123, 980–992. <https://doi.org/10.1152/jn.00397.2019>.

Melzer, S., Michael, M., Caputi, A., Eliava, M., Fuchs, E.C., Whittington, M.A., and Monyer, H. (2012). Long-Range-Projecting GABAergic Neurons Modulate Inhibition in Hippocampus and Entorhinal Cortex. *Science* 335, 1506–1510. <https://doi.org/10.1126/science.1217139>.

Minlebaev, M., Colonnese, M., Tsintsadze, T., Sirota, A., and Khazipov, R. (2011). Early γ oscillations synchronize developing thalamus and cortex. *Science* 334, 226–229. <https://doi.org/10.1126/science.1210574>.

Mizuno, H., Ikezoe, K., Nakazawa, S., Sato, T., Kitamura, K., and Iwasato, T. (2018). Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections. *CellReports* 22, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.012>.

- Mohns, E.J., and Blumberg, M.S. (2008). Synchronous Bursts of Neuronal Activity in the Developing Hippocampus: Modulation by Active Sleep and Association with Emerging Gamma and Theta Rhythms. *Journal of Neuroscience* 28, 10134–10144. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1967-08.2008>.
- Molnár, Z., Luhmann, H.J., and Kanold, P.O. (2020). Transient cortical circuits match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science* 370, eabb2153. <https://doi.org/10.1126/science.abb2153>.
- Murata, Y., and Colonnese, M.T. (2020). GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Science Advances* 6, eaba1430. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1430>.
- Nakagawa, Y. (2019). Development of the thalamus: From early patterning to regulation of cortical functions. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biology* 8, e345. <https://doi.org/10.1002/wdev.345>.
- Overstreet-Wadiche, L., and McBain, C.J. (2015). Neurogliaform cells in cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 16, 458–468. <https://doi.org/10.1038/nrn3969>.
- Pachitariu, M., Stringer, C., Dipoppa, M., Schröder, S., Rossi, L.F., Dalgleish, H., Carandini, M., and Harris, K.D. (2017). Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *Biorxiv* 061507. <https://doi.org/10.1101/061507>.
- Paxinos, Halliday, Watson, and Kassem (2020). *Atlas of the Developing Mouse Brain*.
- Pnevmatikakis, E.A., and Giovannucci, A. (2017). NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods* 291, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>.
- Quattrocchio, G., and Maccaferri, G. (2014). Optogenetic Activation of Cajal-Retzius Cells Reveals Their Glutamatergic Output and a Novel Feedforward Circuit in the Developing Mouse Hippocampus. *J Neurosci* 34, 13018–13032. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1407-14.2014>.
- Rio-Bermudez, C.D., and Blumberg, M.S. (2021). Sleep as a window on the sensorimotor foundations of the developing hippocampus. *Hippocampus*. <https://doi.org/10.1002/hipo.23334>.
- Ronzitti, E., Conti, R., Zampini, V., Tanese, D., Foust, A.J., Klappoetke, N., Boyden, E.S., Papagiakoumou, E., and Emiliani, V. (2017). Submillisecond Optogenetic Control of Neuronal Firing with Two-Photon Holographic Photoactivation of Chronos. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37, 10679–10689. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1246-17.2017>.
- Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>.
- Rübel, O., Tritt, A., Ly, R., Dichter, B.K., Ghosh, S., Niu, L., Soltesz, I., Svoboda, K., Frank, L., and Bouchard, K.E. (2022). The Neurodata Without Borders ecosystem for neurophysiological data science. *Biorxiv* 2021.03.13.435173. <https://doi.org/10.1101/2021.03.13.435173>.
- Siegel, F., Heimel, J.A., Peters, J., and Lohmann, C. (2012). Peripheral and Central Inputs Shape Network Dynamics in the Developing Visual Cortex In Vivo. *Current Biology* 22, 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.026>.
- Siegle, J.H., López, A.C., Patel, Y.A., Abramov, K., Ohayon, S., and Voigts, J. (2017). Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *J Neural Eng* 14, 045003. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa5eea>.
- Supèr, H., and Soriano, E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections

- studied with the lipophilic tracer Dil. *The Journal of Comparative Neurology* 344, 101–120. <https://doi.org/10.1002/cne.903440108>.
- Tricoire, L., Pelkey, K.A., Daw, M.I., Sousa, V.H., Miyoshi, G., Jeffries, B., Cauli, B., Fishell, G., and McBain, C.J. (2010). Common Origins of Hippocampal Ivy and Nitric Oxide Synthase Expressing Neurogliaform Cells. *Journal of Neuroscience* 30, 2165–2176. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5123-09.2010>.
- Tuncdemir, S.N., Wamsley, B., Stam, F.J., Osakada, F., Goulding, M., Callaway, E.M., Rudy, B., and Fishell, G. (2016). Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron* 89, 521–535. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.020>.
- Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., and 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. 1–11. .
- Valeeva, G., Tressard, T., Mukhtarov, M., Baude, A., and Khazipov, R. (2016). An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *J Neurosci Official J Soc Neurosci* 36, 5961–5973. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3482-15.2016>.
- Valeeva, G., Janackova, S., Nasretidinov, A., Rychkova, V., Makarov, R., Holmes, G.L., Khazipov, R., and Lenck-Santini, P.-P. (2019). Emergence of Coordinated Activity in the Developing Entorhinal–Hippocampal Network. *Cereb Cortex* 29, 906–920. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy309>.
- Vertes, R.P. (2015). Chapter 7 Major diencephalic inputs to the hippocampus supramammillary nucleus and nucleus reuniens. *Circuitry and function. Prog Brain Res* 219, 121–144. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.008>.
- Villette, V., Malvache, A., Tressard, T., Dupuy, N., and Cossart, R. (2015). Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information. *Neuron* 88, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.052>.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., and Lowell, B.B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 71, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>.
- Wang, Y., Romani, S., Lustig, B., Leonardo, A., and Pastalkova, E. (2015). Theta sequences are essential for internally generated hippocampal firing fields. *Nature Neuroscience* 18, 282–288. <https://doi.org/10.1038/nn.3904>.
- Weel, M.J.D. der, and Witter, M.P. (2020). THE THALAMIC MIDLINE NUCLEUS REUNIENS: POTENTIAL RELEVANCE FOR SCHIZOPHRENIA AND EPILEPSY. *Neurosci Biobehav Rev* 119, 422–439. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.033>.
- Weel, M.J.D.D., and Witter, M.P. (1996). Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364, 637–650. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19960122\)364:4<637::aid-cne3>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19960122)364:4<637::aid-cne3>3.0.co;2-4).
- Wester, J.C., and McBain, C.J. (2016). Interneurons Differentially Contribute to Spontaneous Network Activity in the Developing Hippocampus Dependent on Their Embryonic Lineage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36, 2646–2662. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4000-15.2016>.
- Zhang, G.-W., Sun, W.-J., Zingg, B., Shen, L., He, J., Xiong, Y., Tao, H.W., and Zhang, L.I. (2018). A Non-canonical Reticular-Limbic Central Auditory Pathway via Medial Septum Contributes to Fear Conditioning. *Neuron* 97, 406–417.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.010>.

Zsiros, V., Aradi, I., and Maccaferri, G. (2007). Propagation of postsynaptic currents and potentials via gap junctions in GABAergic networks of the rat hippocampus. *J Physiology* 578, 527–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.123463>.

Zutshi, I., Valero, M., Fernández-Ruiz, A., and Buzsáki, G. (2021). Extrinsic control and intrinsic computation in the hippocampal CA1 circuit. *Neuron* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.11.015>.

2. Annexe : Résultats non publiés

Cette partie présentera un ensemble de résultats préliminaires sur des projets en cours dans l'équipe faisant suite au travail présenté précédemment. Ces résultats ont notamment été obtenus en collaboration avec Erwan Leprince, doctorant l'équipe.

2.1 Lien entre activité et mouvement

Nos résultats ont permis de confirmer le rôle des twitches dans le déclenchement des activations synchrones observées lors de la première semaine de vie. Une question sous-jacente était de savoir si différents types de twitches entraînaient l'activation d'ensemble de neurones différents et s'il existait des patrons d'activités récurrents selon le type de mouvement du souriceau. Pour essayer de répondre à cette question nous avons combiné l'enregistrement de l'activité calcique de la région de CA1 avec l'enregistrement du comportement du souriceau à l'aide de deux caméras disposées de part et d'autre de la souris. Cela nous a permis d'obtenir une annotation précise du comportement des animaux. Nous avons ensuite pu analyser la similarité des groupes de neurones actifs suite à chacun des types de twitches observés (Figure R1).

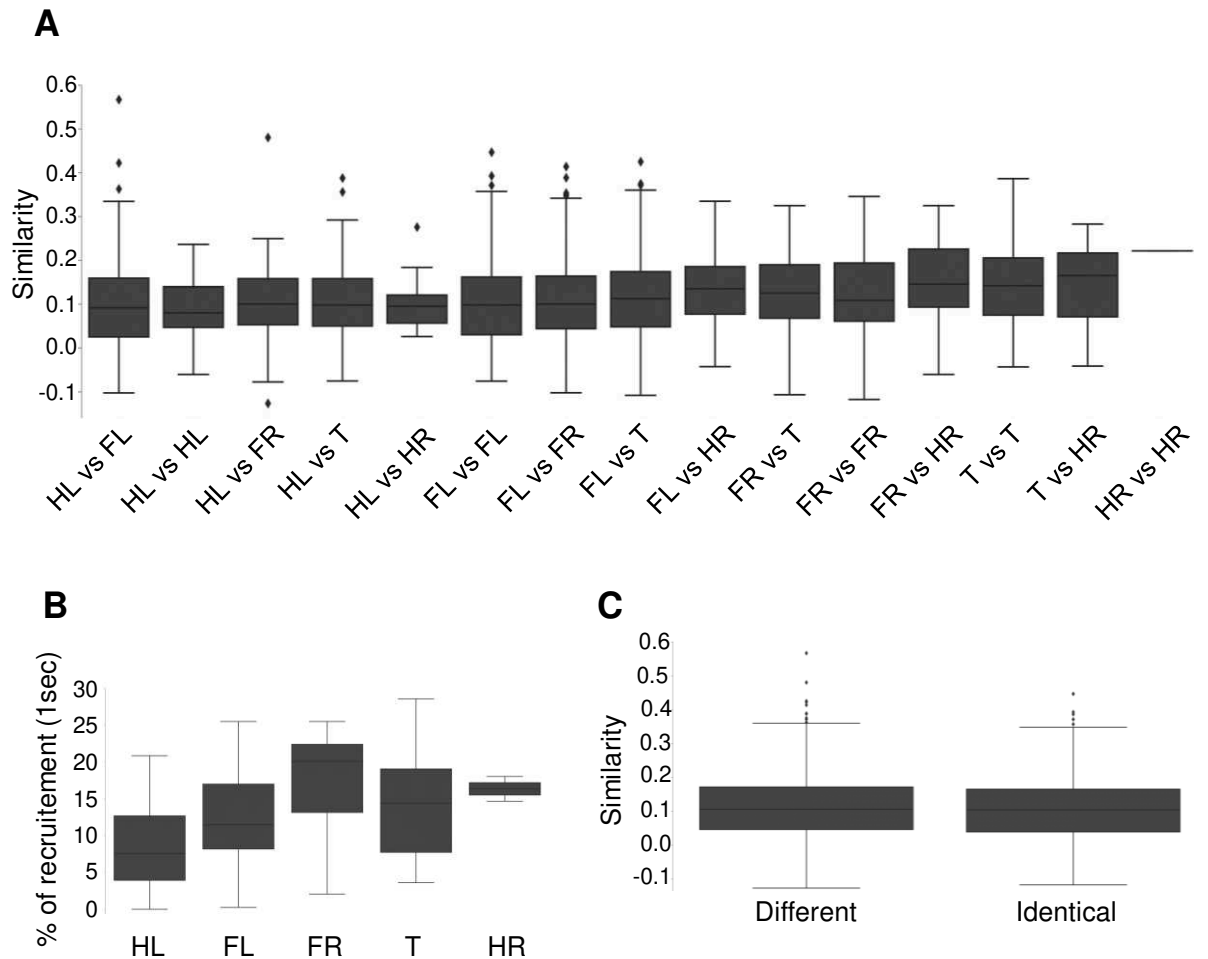


Figure R1 : Comparaison de l'activation de la région de CA1 en réponse à 4 types de twitches pour un animal à P5.

A et C. Une analyse rapide ne met pas en évidence de plus forte similarité dans les ensembles de neurones activés pour des twitches du même membre que pour des membres différents. **B.** Proportion de cellules recrutées dans la seconde suivant un twitch. HL : patte arrière gauche, FL : patte avant gauche, HR : patte arrière droite, FR : patte avant droite, T : queue.

Nos résultats préliminaires semblent indiquer l'absence de patrons d'activation récurrent selon le type de twitches. En effet, sur un échantillon de cinq souris entre P5 et P8, nous n'avons jamais observé de

groupes de neurones activés préférentiellement suite à un certain type de mouvement. Notre hypothèse est donc que le retour sensoriel lié au mouvement transmis à l'hippocampe depuis le cortex entorhinal joue un rôle de déclencheur plutôt que de contrôle dans l'organisation des activités synchrones observées dans la région de CA1 au cours du développement. Une investigation plus précise du rôle du mouvement dans l'activation hippocampique pourrait néanmoins nuancer cette hypothèse.

2.2 Etudes des circuits contrôlant la maturation de l'innervation périsomatique

Les résultats présentés jusque-là ne permettent pas de comprendre les mécanismes et/ou circuits permettant la maturation de l'innervation périsomatique dans la région de CA1. Nous avons émis l'hypothèse que le développement de l'innervation périsomatique issue des interneurons PV dépendrait de l'activité des interneurons SST. Afin de tester cette hypothèse nous avons induit l'expression du DREADD inhibiteur hM4DGi dans les neurones SST de la région de l'hippocampe puis nous avons procédé à une inhibition chronique de ces neurones via des injections de CNO toutes les 8 heures entre P3 et P8 ou entre P3 et P11. Suite à cette inhibition chronique nous avons effectué à P9 ou P12 l'imagerie calcique et/ou une quantification de l'innervation périsomatique (Figure R2A). Dans le cadre de notre hypothèse nous attendions premièrement une réduction de l'innervation périsomatique des cellules PV et deuxièmement une réduction de l'inhibition de cellules pyramidales suite au mouvement des souris.

Dans un premier temps nous avons quantifié le développement de l'innervation périsomatique issu des cellules PV au jour postnatal 9 après inhibition chronique des interneurons SST entre les jours postnataux 3 et 8 (Figure R2B). Pour cela nous avons utilisé le marqueur synaptotagmin 2 (Syt2), reporté comme étant un marqueur fiable des terminaisons des interneurons exprimant la parvalbumine dans le cortex (Sommeijer and Levelt, 2012). Par rapport aux souris contrôles (injectées avec le DREADD inhibiteur et une solution saline ou avec un rapporteur fluorescent et l'agoniste du récepteur DREADD) les souris injectées avec le DREADD et son agoniste montrent une réduction moyenne de 20 % de la couverture de la couche pyramidale de CA1 par le marquage syt2. Nous avons donc un moyen expérimental de manipuler le développement de l'innervation périsomatique des interneurons PV. Pour certains de ces animaux nous avons réalisé l'imagerie calcique dans CA1. L'analyse de ces enregistrements n'a pas mis en évidence de changement dans la réduction d'activité observée suite aux mouvements des souris (résultats non montrés). L'innervation périsomatique dans la couche pyramidale de CA1 est portée par les cellules en panier de type PV mais aussi CCK. Nous avons donc cherché à savoir si l'arborisation axonale des interneurons CCK dans la couche pyramidale était altérée par l'inhibition chronique des interneurons SST. Nos résultats préliminaires suggèrent que cela n'est pas le cas (Figure R2C). On pourrait donc penser que la réduction d'activité des cellules pyramidales suite aux mouvements chez les souris après P9 ne serait pas portée par un effet inhibiteur des cellules PV mais plutôt par les cellules CCK. Cependant il n'est pas encore possible d'exclure que d'autres types d'interneurones soient responsables de cette inhibition. Au-delà de l'inhibition observée suite aux mouvements il sera intéressant d'étudier l'impact de cette réduction de l'arborisation des interneurons en panier de type PV et notamment sur l'organisation de l'activité de CA1 lors des phases d'immobilité et en lien avec le rôle de ces interneurons dans la boucle de rétrocontrôle inhibiteur.

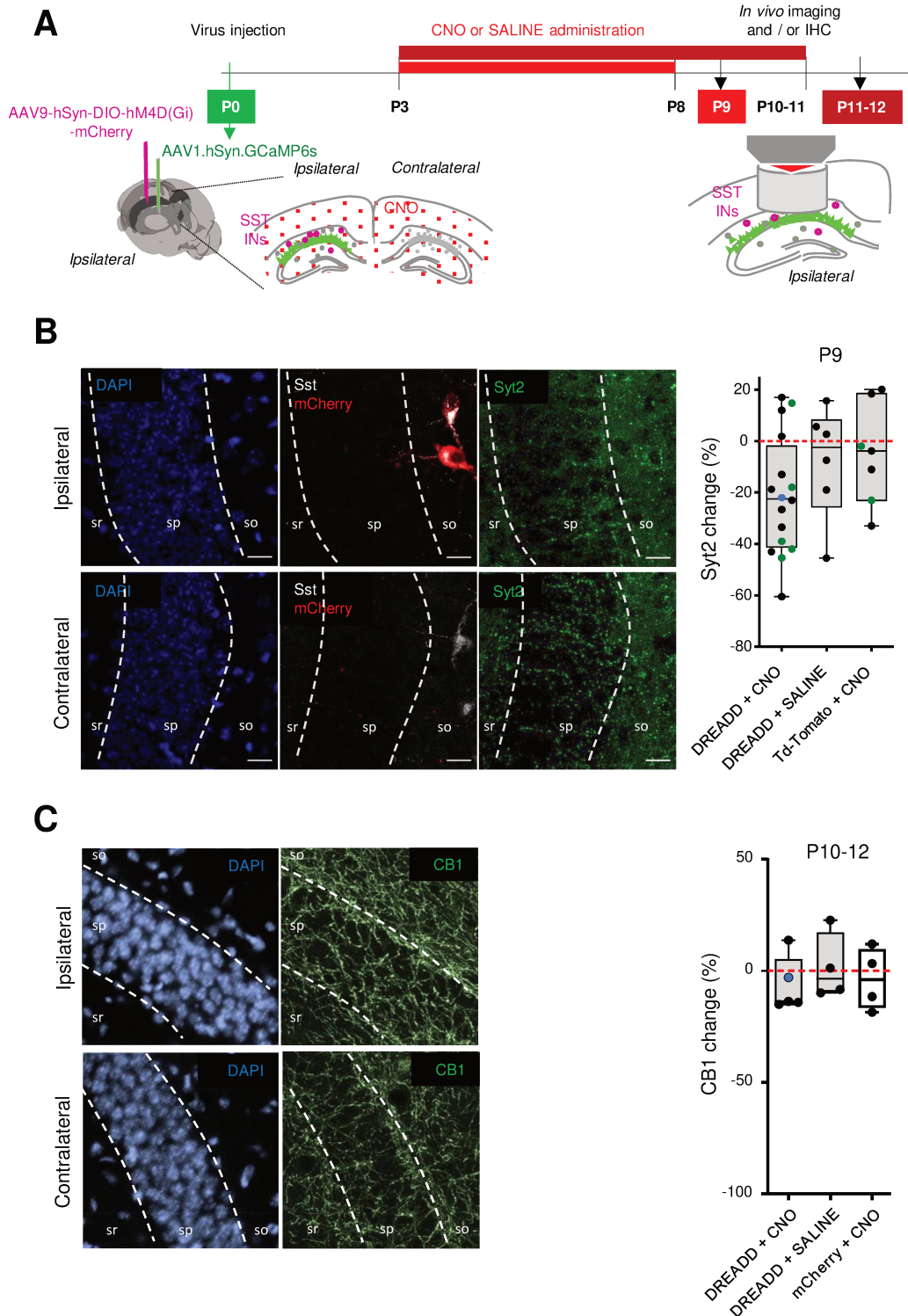


Figure R2 : Inhibition chronique des interneurons SST de l'hippocampe et développement des réseaux inhibiteurs locaux de la région CA1

A. Protocole expérimental permettant l'expression du DREADD inhibiteur hM4DGi dans les interneurons SST de l'hippocampe et de l'indicateur calcique GCaMP6s dans l'ensemble des neurones hippocampiques. Entre P3 et P8 les animaux sont injectés avec du CNO. A P9 le développement anatomique et fonctionnel de l'hippocampe est testé. **B.** Panels de gauche : marquage DAPI, Somatostatine (Sst), m-Cherry (rapporteur de hM4DGi) et Synaptotagmin2 (Syt2) dans la région CA1 de l'hippocampe ipsilatéral (ligne du haut) et de l'hippocampe contralatéral (ligne du bas). On voit notamment la co-expression de la Somatostatine et du DREADD inhibiteur dans le stratum oriens de l'hippocampe ipsilatéral ainsi qu'une réduction du marquage Synaptotagmin2 dans cet hémisphère. Panel de droite : quantification du marquage Syt2 dans la couche pyramidale de la région de CA1

dans les 3 groupes expérimentaux. Les points verts dans le groupe DREADD + CNO représentent les souris pour lesquelles l'activité neuronale a été imagée, le point bleu représente la souris utilisée pour illustration dans les panels de gauche. C. Panel de gauche : marquage DAPI et CB1. Panel de droite : quantification du marquage CB1 dans les 3 groupes expérimentaux.

Une deuxième hypothèse était que l'activité du cortex entorhinal qui participe au déclenchement des activités synchrones précoces serait également impliqué dans le développement de l'innervation périsomatique. Pour tester cette hypothèse nous avons induit l'expression du DREADD inhibiteur hM4DGi dans les cellules excitatrices du cortex entorhinal que nous avons ensuite inhibé de façon chronique entre P3 et P10 ou P11 afin d'observer les conséquences à P11 ou P12 respectivement (Figure R3A).

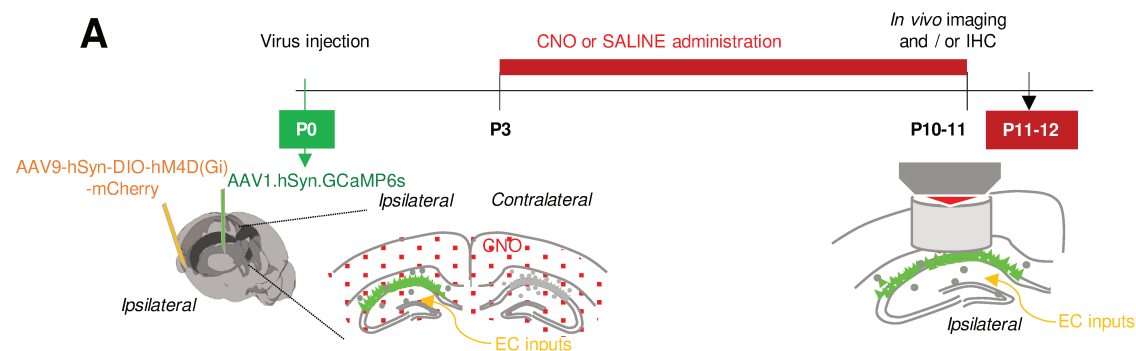


Figure R3 : Inhibition chronique du cortex entorhinal et développement des réseaux inhibiteurs locaux de la région CA1.

A. Protocole expérimental permettant l'expression du DREADD inhibiteur hM4DGi dans les neurones excitateurs du cortex entorhinal et de l'indicateur calcique GCaMP6s dans l'ensemble des neurones hippocampiques. Entre P3 et P10-11 les animaux sont injectés avec du CNO. A P11-12 le développement anatomique et fonctionnel de l'hippocampe est testé.

3. Conclusion / Synthèse sur les résultats

L'ensemble des résultats de ce travail de thèse a permis de décrire l'activité dans la région de CA1 de l'hippocampe lors des deux premières semaines de vie postnatale chez la souris. Nous avons montré le lien déjà établi entre mouvement de la souris et activation de l'hippocampe lors de la première semaine de vie. Cette augmentation d'activité en réponse au mouvement de la souris s'observe aussi bien pour les cellules pyramidales que pour les interneurons. L'étude du rôle du noyau reuniens et du cortex entorhinal, deux régions se projetant dans la région CA1 de l'hippocampe, a permis de mettre en évidence la participation du cortex entorhinal dans le déclenchement des activations synchrones tel que cela été suggéré. Le noyau reuniens semble lui impliqué dans la modulation de l'activité des cellules pyramidales mais pas dans leur synchronisation. Le début de la deuxième semaine de vie postnatale marque une transition rapide autant du point de vue anatomique que fonctionnel. En effet, nous avons pu mettre en évidence une inversion dans la relation entre mouvement et activité autour de P9. Plus précisément, nous avons montré que les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe ont une activité réduite suite au mouvement de la souris après P9, au contraire l'activité des interneurons reste positivement modulée par le mouvement. Au même âge nous avons observé un développement rapide de l'innervation périssomatique inhibitrice sur les cellules de la couche pyramidale de CA1. De plus nous avons montré que l'activité de ces axones inhibiteurs est augmentée suite au mouvement. Nous proposons donc que le développement de l'arborisation axonale des interneurons permet cette transition. Cette transition est également marquée par l'émergence d'activités en dehors des périodes de mouvements ce qui traduit le désengagement de l'hippocampe des inputs sensoriels.

Nous avons pu montrer que le développement de l'innervation périssomatique des interneurons PV dépendait au moins en partie de l'activité des interneurons SST. Cependant une altération de la maturation de l'innervation périssomatique issue des cellules PV n'altérerait pas l'apparition de l'inhibition induite par le mouvement lors de la deuxième semaine de vie postnatale. Une de nos hypothèses est que cette inhibition induite par le mouvement serait portée par les interneurons CCK dont le développement de leur arborisation axonale ne semble pas altéré par l'inhibition chronique des interneurons SST. Pour poursuivre sur le rôle de l'activité dans l'évolution de la région CA1 de l'hippocampe, un protocole d'inhibition chronique du cortex entorhinal lors de la première semaine de vie a été mis en place, les résultats permettront de mieux comprendre le lien entre mouvement et développement de l'hippocampe. Enfin, comme cela a été montré dans le cortex en baril les interneurons générés les plus tôt au cours du développement joue un rôle de « hub » et participe à l'intégration des informations sensorielles, l'identification des neurones « hub » dans la région CA1 de l'hippocampe et leur lien avec le mouvement reste ouverte.

DISCUSSION

1. Objectifs partiels

1.1 Décrire la connectivité de l'hippocampe pendant le développement

Nos résultats suggèrent fortement que le changement observé dans l'activité autour de P9 est médié par le développement de l'innervation périssomatique sur les cellules pyramidales de CA1. Cela correspond à une évolution locale de la connectivité de l'hippocampe. Nous avons utilisé des expériences de traçage rétrograde afin de décrire les connexions reçues par les cellules pyramidales et interneurons de la région CA1 avant et après P9. Conformément à ce que nous pouvions attendre nous avons pu observer des neurones présynaptiques dans le septum médian et dans le cortex entorhinal dès P5. De façon qualitative la connectivité longue distance sur les deux types cellulaires ne semblent pas différente avant et après P9. Le deuxième point était la description de la connectivité locale dans la région CA1 de l'hippocampe autour de la transition que nous avons décrite. Ici notre hypothèse était que le nombre d'interneurons de types PV et CCK présynaptiques seraient plus important après P9 qu'avant. Pour tester cette hypothèse il faut être capable i) de restreindre l'injection du virus 'helper' à CA1, ce qui reste délicat à P0, ii) d'obtenir un nombre de cellules pyramidales 'starter cells' comparable sur tous les animaux (avant et après P9), ce qui dépend également de la précision d'une injection intra-hippocampique chez le souriceau, iii) de pouvoir identifier les interneurons PV et CCK parmi les neurones présynaptiques, ce qui est compliqué en raison de la non expression de la PV avant la troisième semaine de vie.

Deux approches permettraient peut-être de contourner ces limitations. La première est basée sur des injections virales calibrées de façon à réduire fortement le nombre de cellules 'starter cells' jusqu'à moins de quatre dans 48 % des cas et une seule dans 16 % des cas (Jacobsen et al., 2021). Cette méthode développée pour le traçage chez l'animal adulte se base sur des injections virales successives visant à réduire le nombre de 'starter cells'. Pour cela les auteurs injectent en premier lieu un virus dilué CaMKII-Cre *in utero* au stade E13 dans le ventricule latéral, puis chez l'adulte successivement le virus 'helper' et le virus de la rage modifié. Ce procédé pourrait être adapté au développement. En pratique, plutôt que d'injecter un virus 'helper' dont l'expression est dépendante de la recombinaison CRE dans l'hippocampe d'une souris transgénique où la CRE est exprimée dans les cellules excitatrices, il faudrait injecter *in utero* un virus CamKII-Cre fortement dilué, puis à P0 le virus 'helper', et enfin à P5 ou P9 le virus de la rage modifié. Une deuxième approche se base sur l'électroporation d'une cellule unique en se guidant grâce à l'imagerie à 2 photons. Cette approche a été utilisée récemment pour décrire l'activité des interneurons présynaptiques des cellules de lieu dans la région CA1 de l'hippocampe (Geiller et al., 2022). Cette étude montre notamment que chez la souris adulte environ 91 % des entrées locales sur une cellule pyramidale proviennent d'interneurons, avec en moyenne 117 interneurons contactant la cellule pyramidale 'starter cell' ((Geiller et al., 2022) - Extended data fig.1). En combinant une de ces deux approches avec des immunomarquages dirigés contre les interneurons et contre les interneurons CCK spécifiquement il serait envisageable en se focalisant sur la couche pyramidale de quantifier le nombre de cellules CCK et PV (interneurons non CCK de la couche pyramidale) connectant les cellules pyramidales avant et après P9.

1.2 Imagerie calcique chronique lors des deux premières semaines de vie postnatale

L'ensemble des résultats présenté ici se base sur la description de l'activité observée à un instant donné. En effet, il n'a pas été possible d'enregistrer l'activité dans la région CA1 au cours de plusieurs jours chez le souriceau avant P12. Ce suivi longitudinal devient plus réaliste à partir de la troisième semaine de vie (des données non présentées ont par exemple été obtenues sur le même animal entre P12 et P16). Afin de faciliter le suivi d'un même animal après P12, ou de le rendre possible à des stades plus précoces, l'option de l'imagerie à 3 photons est celle qui est retenue. Cette technique d'imagerie permet en effet d'enregistrer l'activité des neurones de l'hippocampe en conservant le cerveau intact (Horton et al., 2013; Ouzounov et al., 2017, 2019). Les premiers tests que nous avons pu réaliser dans le laboratoire de Chris Xu ne nous ont pas permis d'enregistrer dans la région CA1 de l'hippocampe chez le souriceau mais laissent penser que cela serait effectivement possible.

1.3. Meilleure compréhension du lien entre mouvement, activité et maturation de CA1

La compréhension du lien entre les twitches, l'activation de la région CA1 et la maturation de l'hippocampe reste une question ouverte. Une première question est de savoir si les twitches sont nécessaires à la maturation anatomique et fonctionnelle de la région de CA1 et si oui en quoi. Une

seconde question est de savoir si les twitches seraient liés à des patrons d'activation prédictibles et / ou récurrents ou non. Répondre à cette question est en effet important puisque cela pourrait conduire à une interprétation différente du rôle des twitches dans le contrôle de l'activité du réseau hippocampique en développement, ainsi que sur leur contribution à la maturation d'activités dépendantes de l'hippocampe.

A- Influence des 'twitches' sur la maturation de la région CA1 de l'hippocampe

Dans le but d'étudier l'impact des twitches dans la maturation de CA1 au cours du développement, une première approche envisagée a été une restriction du comportement moteur lors des premiers jours de vie postnataux. Cette restriction entraîne un développement anormal des cartes sensorimotrices et conduit à des troubles du mouvement. L'avantage de cette méthode est sa relative simplicité, et elle a déjà été mise en place (Delcour et al., 2018). L'inconvénient principal est que même si le retour sensoriel lié aux twitches est probablement altéré, nous ne savons pas dans quelle mesure cela modifie l'activation de la région de CA1. Une solution pourrait être de décrire l'effet de la restriction sur l'activité dans CA1 en phase aiguë avant de tester une restriction chronique. Un deuxième inconvénient de cette méthode est son impact général sur l'ensemble du circuit permettant le retour sensoriel lié au mouvement et pas uniquement au niveau de l'hippocampe. Une approche plus fine dans cette même direction pourrait être l'utilisation de souris transgéniques conditionnellement déficientes pour les récepteurs proprioceptifs. Cela permettrait de conserver l'initiation des twitches en supprimant le retour sensoriel associé. Cette approche resterait également limitée par son impact sur tout le circuit entre la contraction musculaire et l'activation de l'hippocampe. Enfin, la dernière approche que nous avons voulu mettre en place est l'inhibition chronique du cortex entorhinal. En effet le cortex entorhinal étant le dernier relais dans la transmission de l'information sensorielle liée au mouvement vers l'hippocampe. Cette approche ne permet pas de répondre directement au rôle des twitches puisqu'elle n'influe pas sur leur génération mais permettrait de bloquer le retour sensoriel à l'hippocampe qu'ils génèrent. Même s'il se pourrait que, comme dans le cortex, des bouffées d'activations synchrones dans le cortex entorhinal soient observées indépendamment d'un mouvement (An et al., 2014; Khazipov et al., 2004), cette approche garantit une meilleure spécificité qu'une restriction du comportement moteur. Après avoir montré que l'inhibition du cortex entorhinal entraîne une diminution de l'activation synchrone dans CA1 nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de son inhibition chronique au cours de la première semaine de vie. L'inhibition chronique du cortex entorhinal entre P15 et P21 prévient le développement expérience-dépendant de l'innervation périsonmatique provenant des interneurons CCK sur les cellules granulaires du gyrus denté sans affecter l'innervation périsonmatique inhibitrice provenant des interneurons PV (Feng et al., 2021). Nous proposons donc que l'inhibition chronique du cortex entorhinal lors de la première semaine de vie postnatale altérerait le développement de l'arborisation axonale des CCKBCs mais pas de PVBCs. Si cette hypothèse venait à être vérifiée nous pourrions premièrement conclure à l'existence de deux circuits différents dans le développement des circuits inhibiteurs locaux, un dépendant du mouvement et du cortex entorhinal permettant le développement des CCKBCs et un dépendant de l'activité des SST de l'hippocampe permettant la maturation des PVBCs. En complément l'imagerie des cellules pyramidales en deuxième semaine de vie permettra de savoir si l'activité du cortex entorhinal lors de la première semaine est impliquée dans l'inversion de la relation entre mouvement et activité décrite à P9.

B- Modélisation de l'influence du mouvement sur l'activité de CA1

Nos résultats préliminaires laissent penser que les patrons d'activation observés en première semaine de vie seraient similaires et indépendants du type de twitches. Cependant, nous avons considéré plusieurs approches qui pourraient permettre d'étudier plus finement le lien potentiel entre twitches et activation de la région de CA1. Une première approche se base sur un modèle de transition de probabilité dans une séquence d'événements (Meyniel et al., 2016). Ce modèle permet en se basant sur la probabilité de transition d'estimer un niveau de surprise à la présentation d'un événement. Cela permet ensuite de corrélérer le niveau d'activation neuronale observée avec la surprise estimée. Nous avons tenté d'appliquer cette méthode à nos données combinées d'imagerie calcique et de comportement. Ici notre hypothèse est que la réponse de l'hippocampe serait plus faible lorsqu'un twitch est plus probable. Malheureusement cela n'a pas encore abouti. Une deuxième approche est de poser directement la question de savoir s'il est possible de prédire l'activité (à l'échelle de la population et du neurone unique) directement par la visualisation du comportement de l'animal, ou inversement s'il est possible de prédire le comportement à partir des données d'imagerie uniquement. Cette approche se base sur de

l'apprentissage profond non supervisé. S'il était possible de prédire le comportement de l'animal à partir des données d'imagerie cela sous-tendrait l'existence d'une structure dans l'activité neuronale jusqu'alors non mise en évidence. Enfin, CEBRA, une méthode récemment développée pourrait peut-être répondre à ce besoin (Schneider et al., 2022). Cette méthode est basée sur de l'apprentissage profond non supervisé permettant l'interprétation simultanée de comportement et de l'activité multi-neuronale. Cette approche permet également de décoder le comportement de l'animal à partir de l'analyse de l'activité de la population de neurones enregistrés. Il serait donc envisageable de l'utiliser et d'entraîner ce réseau de neurones artificiels à produire le film de comportement du souriceau à partir des données d'imagerie calcique. Si le comportement était prédit de façon correcte on pourrait conclure qu'il existe une structure sous-jacente liée aux mouvements dans l'activité de CA1 lors du développement postnatal précoce.

1.4 Rôle de l'activité précoce dans la maturation de la région CA1 de l'hippocampe

Les activités coordonnées observées lors du développement précoce dans l'hippocampe sont supposées essentielles pour le bon développement des circuits hippocampiques. Comme cela a été introduit dans le contexte du cortex visuel et du cortex en baril, le développement peut être dépendant de l'activité et/ou de l'expérience. De plus, les activités dans le cortex en développement peuvent être permissives ou instructives dans la mise en place des circuits neuronaux. Dans le contexte de l'hippocampe, et principalement lors de la première semaine de vie, nous proposons que l'activité participerait au développement de la région CA1 notamment en permettant la maturation des circuits inhibiteurs locaux au niveau de la couche pyramidale. Nous avons envisagé deux approches présentées dans les deux parties suivantes pour avancer sur cette problématique.

A- Participation de l'activité des interneurones hub

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, une sous population d'interneurones qualifiée de neurones hub joue un rôle important dans la coordination des activités du réseau de l'hippocampe en développement. Dans le cortex en barils en développement, ces neurones semblent être déterminant dans le lien entre stimulation sensorielle et maturation locale des interneurones PV. Le rôle potentiel des neurones hub dans la coordination des activités de la région CA1 *in vivo* lors du développement ainsi que leur implication dans la maturation du réseau reste une question ouverte. Plusieurs approches peuvent être envisagées pour adresser ces questions.

Une manière indirecte de cibler ces interneurones est d'utiliser le fait qu'il s'agit souvent d'interneurones SST. Nous avons tiré avantage de cette approche et montré que l'activité des interneurones SST participe au développement de l'arborisation axonale des interneurones PV au sein de la couche pyramidale de la région de CA1. Il est donc possible que les interneurones hub contribuent à ce phénomène activité dépendant. Ce résultat soulève de nouvelles questions quant aux mécanismes sous-jacents. Ici deux hypothèses ont été envisagées. La première serait que via une connexion directe entre les interneurones SST et PV permettrait au premier d'induire l'activité des seconds et que cela permettrait la maturation des cellules PV. Afin de tester cette hypothèse il est envisageable de tester les connexions entre ces deux types cellulaires grâce à de l'électrophysiologie *in vitro*. Une deuxième hypothèse est liée à l'activité paracrine des cellules SST. En effet il a été récemment montré une régulation positive du développement de l'innervation péricellulaire inhibitrice issue des interneurones PV par un mécanisme paracrine dépendant des interneurones SST (Su et al., 2020).

Du point de vue fonctionnel, plusieurs options sont possibles pour décrire plus précisément le rôle des potentiels neurones hub dans les activités développementales de la région de CA1. De façon directe une première option possible serait d'utiliser une lignée de souris transgéniques permettant d'identifier les interneurones exprimant le récepteur M2 (exprimé par les interneurones hub *in vitro* et par les cellules TORO - voir introduction) tout en réalisant l'imagerie calcique *in vivo* à l'échelle de la population entière (Szabo et al., 2022). Cette approche permettrait à la fois de décrire le lien entre mouvement et activité d'une population d'interneurones au sein de laquelle il est très probable de retrouver des neurones hub et de décrire le lien fonctionnel entre l'activité de ces neurones, l'activité des cellules pyramidales et celle des autres interneurones. Une deuxième option serait, comme cela a déjà été utilisé dans l'équipe, de combiner l'imagerie de la couche pyramidale de la région de CA1 avec la photostimulation ou photoinhibition ciblée des interneurones SST. Nous avons tenté la photostimulation ciblée d'interneurones SST combinée avec l'imagerie calcique dans la région CA1 sur quelques animaux à P7 sans résultats probants, cela pourrait être réalisé à nouveau.

D'un point de vue anatomique, il serait précieux d'étudier les connexions entrantes et sortantes de ces neurones. Pour cela nous nous appuyerions sur les approches de traçage rétrograde déjà évoquées précédemment en restreignant le groupe de 'starter cells' aux interneurons SST ou même plus spécifiquement aux interneurons générés les plus tôt en combinant traçage rétrograde et 'genetic fate mapping'. Inversement le traçage antérograde permettrait de déterminer les connexions sortantes de ces cellules.

B- Participation des entrées extrinsèques

Nos résultats ont mis en évidence le rôle du cortex entorhinal dans le déclenchement des activités synchrones en première semaine de vie postnatale. La question de la participation des entrées entorhinales sur l'hippocampe à la maturation de CA1 a déjà été discutée via le lien avec les twitches. Le deuxième type d'entrées que nous avons étudié est celui en provenance du thalamus ventro-médian. Ces entrées excitatrices sur l'hippocampe participent à la modulation de l'activité des cellules pyramidales via un effet sur les interneurons du *stratum lacunosum moleculare* mais n'ont pas d'impact majeur sur le déclenchement des activités synchrones *in vivo* lors de la première semaine de vie. Cela est consistant avec le rôle de ce noyau thalamique montré chez l'adulte, où il joue notamment un rôle de relais entre le cortex préfrontal et l'hippocampe (voir revue (Dolleman-van der Weel et al., 2019)). Puisque nous avons décrit l'apparition d'activités indépendamment des mouvements des souriceaux lors de la deuxième semaine de vie postnatale, il est possible que ce noyau soit impliqué dans la maturation du réseau de CA1 lors de cette période développementale. Une troisième région marquée dans nos expériences de traçage rétrograde sur l'hippocampe est le septum médian. Il serait envisageable d'étudier la participation des projections du septum médian à la coordination des activités précoces de CA1 *in vivo*.

2. Un maillon manquant : imagerie de l'activité dans les 3^{ème} et 4^{ème} semaines de vie ?

Ce travail de thèse initialement pensé pour étudier l'émergence des séquences et assemblées telles que décrites dans l'hippocampe de la souris adulte a finalement porté sur la description de l'évolution de l'activité neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe au cours des deux premières semaines de vie postnatale. Afin de se rapprocher de cette question initiale, cette partie abordera les maillons manquants de la séquence développementale aboutissant à l'émergence de ces patrons d'activités. La deuxième semaine de vie est marquée par l'apparition soudaine d'une réduction de l'activité des cellules pyramidales de CA1 avec une forte activation désynchronisée de ces dernières lors des périodes d'immobilité de la souris. Ces résultats sont en contraste avec la description de l'activité dans CA1 chez la souris adulte caractérisée, de façon schématique, par une augmentation de l'activité lors des périodes de courses ou d'exploration et par une activité hors sharp-wave ripple (SW) lors des périodes d'immobilité. Nous avons des raisons de penser qu'après l'ouverture des yeux (P13) et en association avec le début de l'exploration active de son environnement par l'animal les troisième et quatrième semaines correspondent à une période développementale dépendante de l'expérience aboutissant à de nouvelles transitions majeures.

2.1 Renversement de la relation mouvement-activité ?

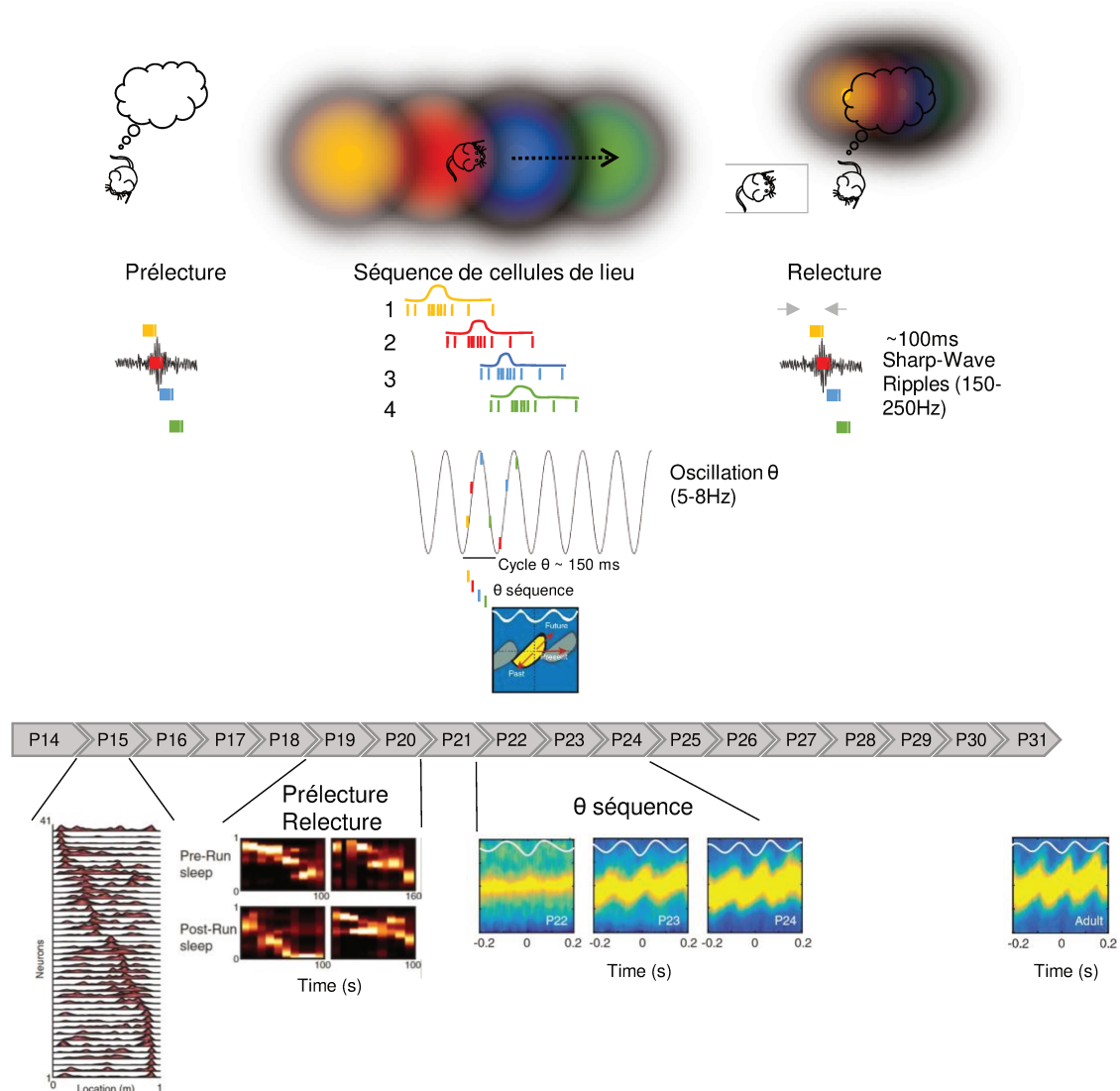
Dès la quatrième semaine de vie postnatale, comme chez la souris adulte, une augmentation de l'activité dans la région de CA1 est observée en association avec la locomotion (Cretella en cours). Cela suggère que l'inhibition observée dans CA1 suite au mouvement de l'animal n'est que transitoire. De façon similaire, une inhibition transitoire est également présente dans le cortex en baril en réponse à la stimulation des vibrisses au début de la deuxième semaine de vie (Bollmann et al., en révision). Cette période marquée par une inhibition transitoire coïncide avec le développement abrupt de l'innervation périsomatique inhibitrice dans ces deux régions corticales. On pourrait proposer que durant cette période cet accroissement rapide de l'innervation périsomatique inhibitrice reçu par les cellules excitatrices causerait une inhibition transitoire en conséquence d'un déséquilibre temporaire d'une balance excitation / inhibition dans le réseau local.

Une augmentation de l'activité neuronale lors des périodes de course ou d'exploration est observée dans plusieurs autres régions corticales (pour le cortex visuel voir par exemple (Stringer et al., 2019)). Nous nous attendons donc à ce qu'une transition en ce sens se produise lors de la troisième

semaine de vie. Une telle transition pourrait être liée à l'apparition du comportement exploratoire qui modifierait profondément l'état cérébral global de l'animal et par conséquent l'activité de l'hippocampe. Cette augmentation globale de l'activité neuronale est notamment portée par des effets neuromodulateurs (voir revue (Lee and Dan, 2012)) et notamment via le locus coeruleus qui fournit une source d'innervation adrénergique à l'hippocampe et au néocortex (Berridge and Waterhouse, 2003). Cette innervation adrénergique impliquée dans la régulation de l'état d'éveil et des activités corticales associées à cet état (voir revue (Berridge and Waterhouse, 2003)) se met en place au cours du développement postnatal autour de P9 chez le rat (Foote and Morrison, 1987; Levitt and Moore, 1979).

2.2 Emergence de l'activité séquentielle et des assemblées lors de la 4^{ème} semaine ?

L'analyse de nos données n'a jamais donné lieu à la mise en évidence d'activation neuronale séquentielle et récurrente comme cela est bien décrit dans l'hippocampe adulte. Nous n'avons pas non plus observé d'organisation en assemblées neuronales. L'émergence de ces patrons d'activités au cours du développement commence à être décrite (Figure D1). Chez le rat juvénile, naviguant dans un environnement linéaire vraisemblablement indicé, les premières séquences formées par des cellules de lieu sont observées à partir de P15 (Farooq and Dragoi, 2019; Muessig et al., 2019). Ces deux études montrent également l'apparition de l'activité séquentielle compressée au sein d'un cycle thêta – appelée dans la suite thêta séquence - entre P23 et P25. Chez la souris adulte se déplaçant dans un environnement, une thêta séquence récapitule au sein d'un cycle thêta la séquence de cellules de lieu observée à l'échelle temporelle du déplacement de l'animal dans son environnement. Ainsi une thêta séquence est constituée par l'activation rapprochée des cellules de lieu des champs de positions précédents, présents et futurs. De par cette caractéristique il est proposé que ces thêta séquences participent à la formation de mémoire apparentée à la mémoire épisodique, mais aussi à la planification d'un trajectoire de navigation (pour revue voir par exemple (Drieu and Zugaro, 2019)). Un troisième type d'activité séquentielle lié à la prélecture ou relecture des séquences de cellules de lieu est caractérisé dans l'hippocampe. Ce type d'activité séquentielle se produit à une échelle de temps très courte dans la composante ripple des oscillations de type 'sharp-wave ripples' se produisant lors des phases d'éveil calme ou de sommeil lent. La suppression de ces événements de relecture lors des phases de sommeil lent suivant un apprentissage perturbe la consolidation de ce dernier (Girardeau et al., 2009). Le rôle fonctionnel des événements de prélecture dans la formation ou la consolidation d'une mémoire ou d'un apprentissage n'est pas clairement défini. Ces événements sont proposés être un « réservoir » préexistant de séquences (Dragoi and Tonegawa, 2011, 2013, 2014). A la résolution temporelle de l'imagerie calcique ces événements de type prélecture / relecture sont décrits comme des événements synchrones recrutant une partie des cellules impliquées dans une séquence observée à l'échelle temporelle du comportement (Malvache et al., 2016). Au cours du développement cette activité séquentielle lors des événements de prélecture ou relecture se met en place entre P17 et P24 (Farooq and Dragoi, 2019; Muessig et al., 2019); pour revue voir (Cossart and Khazipov, 2022)).



Séquence de cellules de lieu

Figure D1 : Illustration des 3 types d'activités séquentielles caractéristiques de la région CA1 de l'hippocampe et leur mise en place au cours du développement chez le rat juvénile.

Les séquences de cellules de lieu sont les premières à être observées à partir de P15 chez le rat faisant des aller-retours dans un couloir linéaire. Les premiers événements de prélecture et relecture associés à la composante ripple des oscillations de type « sharp-wave ripples » sont observés à partir de P19 respectivement lors du sommeil avant et après la tâche de navigation. Enfin l'organisation en séquence au sein d'un cycle thêta lors des phases de déplacement émergent autour de P23.

Nous avons enregistré l'activité de la région de CA1 de l'hippocampe chez des souris juvéniles entre P12 et P30 simultanément avec leur comportement sur un tapis roulant non-motorisé dépourvu d'indices sensoriels. Ce type d'enregistrement sera répété dans plusieurs conditions expérimentales variant la disponibilité en indices sensoriels et combiné avec un suivi longitudinal afin de décrire l'émergence de ces patrons d'activités lors des troisième et quatrième semaines de vie (Cretella en cours).

2.3 Contrainte développementale sur l'émergence des séquences

L'émergence de ces patrons d'activités pourrait être contrainte par des facteurs développementaux. Dans cette direction une étude suggère que l'utilisation des stimulations optogénétiques permet la mise en place de cellules de lieu en fonction des champs de lieu préexistants mais subliminaux (McKenzie et al., 2019). Comme mentionné dans l'introduction cette prédétermination relative pourrait dépendre de l'âge de naissance embryonnaire des cellules (Cavaliere et al., 2021; Huszár et al., 2022). En lien avec

ces données, plusieurs travaux sont en cours dans l'équipe. Premièrement, l'équipe s'intéresse à savoir si les cellules localisées dans les parties profondes et superficielles de la couche pyramidale sont impliquées de la même façon dans l'émergence des activités séquentielles. Deuxièmement, au-delà de l'influence d'une date de naissance embryonnaire similaire, l'équipe cherche à savoir comment s'organise l'activité des cellules ayant une même origine clonale par rapport à des cellules non apparentées.

3. Désengagement des inputs sensoriels : un processus développemental commun au cortex ?

Chez la souris adulte, l'activité neuronale dans le cortex adulte est décrite comme une activité permanente sur laquelle s'ajoute des activations liées à des stimuli sensoriels externes (voir par exemple (Buzsáki, 2006) – chapitre 10 ; (Ringach, 2009)). En d'autres termes l'activité d'une région corticale combine des informations internes – en provenance d'une autre région – avec des informations externes provenant de stimulations sensorielles. Par exemple, le cortex visuel primaire combine des informations relatives aux mouvement des muscles de la face (Stringer et al., 2019) ou relatives à la locomotion (voir par exemple (Keller et al., 2012; Vinck et al., 2015)) avec des informations liées aux stimuli visuels. Ces constatations s'étendent à de nombreuses régions telles que le cortex frontal, aux régions sensorimotrices, l'hippocampe, le striatum, le thalamus (Stringer et al., 2019). Par exemple dans le cortex visuel ces informations en provenance d'autres régions corticales sont pensées permettre à l'animal de créer une représentation mentale précédant l'expérience visuelle. Dans ce contexte un stimulus visuel est alors comparé à ce qui était attendu, c'est la théorie du codage prédictif (pour revue voir par exemple (Keller and Mrsic-Flogel, 2018; Ringach, 2009)). Dans cette théorie, une information provenant d'un stimulus externe est donc comparée à une représentation préexistante issue d'informations dites internes, et permet l'actualisation de la représentation. Il apparaît donc qu'une grande partie de l'activité corticale est désengagée des entrées sensorielles.

Ce constat est en opposition avec la description que nous avons faite de l'activité de la région de CA1 lors du développement postnatal précoce. Il ressort de nos résultats qu'une première étape de désengagement des entrées sensorielles se produit autour de P9 possiblement en lien avec le développement du réseau inhibiteur local. Cependant, nous ne pouvons pas montrer que l'activité se produisant lors des phases de non-mouvement lors de la deuxième semaine de vie postnatale est indépendante de toutes modalités sensorielles ni qu'elle ne porte une représentation interne de l'environnement du souriceau. Comme discuté précédemment, l'émergence de ces représentations portées par des activités séquentielles dans l'hippocampe est plus tardive au cours du développement. Cependant, le désengagement de l'entrée sensorielle pouvant être associée à une transition entre activité discontinue et activité continue semble être une première étape critique. Cette partie s'intéressera à ce phénomène dans le cortex visuel et dans le cortex en baril.

Comme dans l'hippocampe, l'activité dans le cortex visuel lors de la première semaine de vie postnatale est très discontinue. Elle se caractérise par l'alternance entre des activités neuronales synchrones associées aux oscillations de types spindle burst générées par les vagues rétinienne (voir introduction pour la participation des vagues rétinienne au développement du système visuel) et des périodes de silence de longue durée pouvant s'étendre jusqu'à plusieurs dizaines de secondes (Colonnese et al., 2010). Chez le rat cette activité corticale devient très rapidement continue à P12 après une période transitoire entre P8 et P11 marquée par l'apparition des premières réponses à des flashes lumineux avant l'ouverture des yeux (Colonnese et al., 2010). L'émergence de cette continuité dans l'activité du cortex visuel permet une transition vers un traitement de l'information visuelle plus proche de celle observée chez l'animal adulte, juste avant l'ouverture des yeux et le début de l'exploration active de son environnement par le souriceau (Colonnese et al., 2010). Cette même étude reporte également l'apparition d'une modulation de l'activité corticale par l'état général du cerveau entre P13 et P15 possiblement en lien avec une évolution des systèmes neuromodulateurs.

Ce même type de transition d'une activité discontinue vers une activité continue est observée dans le cortex en baril autour de P7-8 ((Colonnese et al., 2010) et voir revue (Luhmann and Khazipov, 2018)). De façon similaire aux observations faites dans le cortex visuel, cette transition s'accompagne d'une période transitoire entre P8 et P9 durant laquelle la bouffée d'activité en réponse à une stimulation

sensorielle des vibrisses disparaît au profil de la mise en place d'une activité continue. Ce phénomène pourrait correspondre à la période d'inhibition transitoire observée à P9 en imagerie *in vivo* à 2 photons suite à la stimulation des vibrisses (Bollmann et al, en révision). Cette période transitoire et l'émergence de l'activité continue dans le cortex en baril précède de quelques jours seulement le début de l'exploration et des mouvements volontaires des vibrisses (van der Bourg et al., 2017).

De plus, ces périodes transitoires précédant l'émergence d'activité corticale continue sont marquées par le développement de l'innervation périsomatique inhibitrice (voir introduction). Comme nous l'avons montré en utilisant un modèle de réseau de neurones à deux populations, ce développement des circuits inhibiteurs locaux participe à la décorrélation de l'activité après P9 (Dard et al., 2022). Une observation similaire a été faite dans le cortex préfrontal, où la décorrélation de l'activité observée au cours de la deuxième semaine de vie postnatale chez la souris serait portée par un changement de la balance excitation / inhibition en faveur de l'inhibition (Chini et al., 2021). De façon similaire dans le cortex moteur c'est entre P11 et P12 que le développement de l'inhibition locale conduit à une forte diminution de la proportion de neurones s'activant suite aux twitches. Ce désengagement du cortex moteur primaire du retour sensoriel lié aux twitches permet une transition vers un rôle « moteur » même si des entrées sensorielles persistent après P12 (Dooley and Blumberg, 2018). Que ce soit d'un point de vue anatomique ou fonctionnel cette transition développementale présente dans le cortex visuel ou dans le cortex en baril mais sûrement aussi dans le cortex préfrontal correspond donc à la transition que nous avons mis en évidence à P9 dans la région CA1 de l'hippocampe.

4. Twitches et aspects évolutifs du développement précoce

Au-delà de présenter des similitudes entre les différentes aires corticales chez la souris, certaines étapes du développement et certains aspects sont conservés d'un point de vue évolutif à plusieurs autres espèces. Selon cet angle, cette section s'intéressera au rôle des twitches dans le développement.

De façon similaire à la conservation du sommeil paradoxal dans le règne animal, l'émergence de twitches lors du sommeil est une caractéristique commune à de nombreuses espèces lors du développement postnatal (Blumberg et al., 2013b; Corner, 1977; Jouvet-Mounier et al., 1969). Les twitches présentent la particularité de se produire lors du sommeil paradoxal, donc lors d'une période d'atonie musculaire. Le contraste entre l'atonie musculaire et le retour sensoriel lié aux twitches est supposé permettre une mise en relation plus facile entre le signal moteur à l'origine des twitches et le retour sensoriel (Blumberg et al., 2013b). Les twitches seraient donc un « outil » idéalement placé pour la maturation des systèmes sensorimoteurs. Le rôle des twitches dans l'émergence du réflexe de retrait nociceptif a déjà été évoqué (Petersson et al., 2003; Schouenborg, 2008). Les twitches permettraient également le développement de trois autres réflexes sensorimoteurs (Marques et al., 2013): le réflexe myotatique (réponse de contraction musculaire en réponse à une extension, (Chen et al., 2003)), le réflexe inhibition réciproque (relâchement du muscle antagoniste lors de la contraction de l'agoniste) et le réflexe d'étirement inverse (auss appelé réflexe tendineux de Golgi, réponse de relâchement en réponse à une tension musculaire trop forte). Dans cette étude les auteurs proposent un cadre théorique composé de 5 modèles interagissant entre eux ((Marques et al., 2013), figure 1). En premier lieu, une commande motrice similaire aux twitches est générée entraînant ensuite l'activation d'un moteur agissant sur un système musculaire. De façon comparable avec la description des twitches chez l'animal, dans ce modèle les twitches sont des activations courtes (1 seconde) activant de façon aléatoire un seul muscle lors d'une période d'atonie musculaire (absence d'autre stimulation sensorielle). Troisièmement, les changements provoqués sur le système musculaire sont perçus par un système de détection et quatrièmement convertis en activité dans ces détecteurs. Enfin, l'activité du détecteur est corrélée à la commande motrice initiale afin d'établir une connectivité entre chaque récepteur et chaque effecteur. Ce modèle montre que ces trois réflexes peuvent être mis en place de façon autonome à partir de répétition de twitches avec une simple règle de corrélation entre la commande motrice et le retour sensoriel (Marques et al., 2013). Au-delà de cette approche de modélisation, l'hypothèse de l'auto-organisation des fonctions sensorimotrices à partir de l'expérience sensorielle liée aux twitches a été testée en robotique (Enander et al., 2022). Cette étude montre qu'un robot peut utiliser une phase de développement sensorimoteur au cours de laquelle la génération aléatoire de twitches entraîne un retour sensoriel permettant la mise en place de la connexion (Ia) entre un fuseau musculaire et les motoneurones du même muscle (Enander et al., 2022), connexion supportant elle-même le réflexe

myotatique. Les twitches sont donc conservés dans l'évolution et premièrement essentiels à la maturation du système sensorimoteur. Comme cela a été introduit, ils participent également au développement d'aires sensorielles du néocortex, il est possible que l'évolution ait sélectionné une réutilisation de ce phénomène développemental pour la maturation d'aires corticales impliquées dans des processus cognitifs de plus haut ordre telle que l'hippocampe.

Une idée évoquée dans l'introduction est que le mouvement et le déplacement dans un environnement sont à l'origine des activités séquentielles dans l'hippocampe et qu'un processus évolutif est à l'origine de leur réutilisation dans d'autres procédés cognitifs que la navigation spatiale (Buzsáki and Moser, 2013). De façon intéressante, ces différentes étapes sont peut-être récapitulées lors du développement. En effet, le développement précoce est marqué par l'abondance des mouvements de types twitches, puis apparaît la capacité à se déplacer et le comportement d'exploration actif. Peu de temps après l'apparition de ce comportement, l'activité séquentielle caractéristique de l'hippocampe se met en place. Comme cela est de plus en plus admis, il semblerait donc que l'hippocampe puisse être considéré comme une structure sensorimotrice lors de développement précoce avant de devenir progressivement la structure cognitive décrite chez l'animal adulte.

REFERENCES

- Ackman, J.B., and Crair, M.C. (2014). Role of emergent neural activity in visual map development. *Current Opinion in Neurobiology* 24, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.11.011>.
- Adelsberger, H., Garaschuk, O., and Konnerth, A. (2005). Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci* 8, 988–990. <https://doi.org/10.1038/nn1502>.
- Alcàntara, S., Ferrer, I., and Soriano, E. (1993). Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol* 188. <https://doi.org/10.1007/BF00191452>.
- An, S., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2014). Sensory-Evoked and Spontaneous Gamma and Spindle Bursts in Neonatal Rat Motor Cortex. *J Neurosci* 34, 10870–10883. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4539-13.2014>.
- Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., and Fanselow, M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8–17. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7).
- Anstötz, M., Quattrocchio, G., and Maccaferri, G. (2018). Cajal-Retzius cells and GABAergic interneurons of the developing hippocampus: Close electrophysiological encounters of the third kind. *Brain Research* 1697, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.07.028>.
- Antonini, A., and Stryker, M.P. (1993). Rapid Remodeling of Axonal Arbors in the Visual Cortex. *Science* 260, 1819–1821. <https://doi.org/10.1126/science.8511592>.
- Antonini, A., and Stryker, M.P. (1996). Plasticity of geniculocortical afferents following brief or prolonged monocular occlusion in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 369, 64–82. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960520\)369:1<64::AID-CNE5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960520)369:1<64::AID-CNE5>3.0.CO;2-I).
- Arriaga, M., and Han, E.B. (2017). Dedicated Hippocampal Inhibitory Networks for Locomotion and Immobility. *J. Neurosci.* 37, 9222–9238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1076-17.2017>.
- Babji, R., and De Marco Garcia, N. (2016). Neuronal activity controls the development of interneurons in the somatosensory cortex. *Front Biol (Beijing)* 11, 459–470. <https://doi.org/10.1007/s11515-016-1427-x>.
- Baram, T.Z., Donato, F., and Holmes, G.L. (2019). Construction and disruption of spatial memory networks during development. *Learn Mem* 26, 206–218. <https://doi.org/10.1101/lm.049239.118>.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416, 303–325. .
- Berridge, C.W., and Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42, 33–84. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(03)00143-7).
- Bird, C.M., and Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* 9, 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>.
- Blumberg, M.S., and Lucas, D.E. (1994). Dual mechanisms of twitching during sleep in neonatal rats. *Behavioral Neuroscience* 108, 1196–1202. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.108.6.1196>.

- Blumberg, M.S., and Lucas, D.E. (1996). A developmental and component analysis of active sleep. *Developmental Psychobiology* 29, 1–22. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199601\)29:1<1::AID-DEV1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199601)29:1<1::AID-DEV1>3.0.CO;2-Y).
- Blumberg, M.S., Coleman, C.M., Gerth, A.I., and McMurray, B. (2013a). Spatiotemporal Structure of REM Sleep Twitching Reveals Developmental Origins of Motor Synergies. *Current Biology* 23, 2100–2109. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.055>.
- Blumberg, M.S., Marques, H.G., and Iida, F. (2013b). Twitching in Sensorimotor Development from Sleeping Rats to Robots. *Current Biology* 23, R532–R537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.075>.
- Blumberg, M.S., Lesku, J.A., Libourel, P.-A., Schmidt, M.H., and Rattenborg, N.C. (2020). What Is REM Sleep? *Curr Biol* 30, R38–R49. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.045>.
- Bocchio, M., Gouny, C., Angulo-Garcia, D., Toulat, T., Tressard, T., Baude, A., and Cossart, R. (2019). Hippocampal hub neurons maintain unique functional properties throughout their lifetime. *BioRxiv* 813923. <https://doi.org/10.1101/813923>.
- Bocchio, M., Gouny, C., Angulo-Garcia, D., Toulat, T., Tressard, T., Quiroli, E., Baude, A., and Cossart, R. (2020). Hippocampal hub neurons maintain distinct connectivity throughout their lifetime. *Nat Commun* 11, 4559. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18432-6>.
- Bodor, A.L. (2005). Endocannabinoid Signaling in Rat Somatosensory Cortex: Laminar Differences and Involvement of Specific Interneuron Types. *Journal of Neuroscience* 25, 6845–6856. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0442-05.2005>.
- Bolea, S., Sanchez-Andres, J.V., Huang, X., and Wu, J. (2006). Initiation and Propagation of Neuronal Coactivation in the Developing Hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 95, 552–561. <https://doi.org/10.1152/jn.00321.2005>.
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1175509>.
- van der Bourg, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Laurenczy, B., Wieckhorst, M., Stüttgen, M.C., Luhmann, H.J., and Helmchen, F. (2017). Layer-Specific Refinement of Sensory Coding in Developing Mouse Barrel Cortex. *Cerebral Cortex* 27, 4835–4850. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw280>.
- Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the Brain* (Oxford University Press).
- Buzsáki, G., and Moser, E.I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16, 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>.
- Buzsáki, G., and Tingley, D. (2018). Space and time: The hippocampus as a sequence generator. *Trends Cogn Sci* 22, 853–869. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.07.006>.
- Callaway, E., and Katz, L. (1992). Development of axonal arbors of layer 4 spiny neurons in cat striate cortex. *J. Neurosci.* 12, 570–582. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00570.1992>.
- Callaway, E.M., and Katz, L.C. (1991). Effects of binocular deprivation on the development of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 745–749. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.745>.
- Capogna, M. (2011). Neurogliaform cells and other interneurons of stratum lacunosum-moleculare gate entorhinal–hippocampal dialogue. *The Journal of Physiology* 589, 1875–1883. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201004>.

- Causseret, F., Moreau, M.X., Pierani, A., and Blanquie, O. (2021). The multiple facets of Cajal-Retzius neurons. *Development* 148, dev199409. <https://doi.org/10.1242/dev.199409>.
- Cavalieri, D., Angelova, A., Islah, A., Lopez, C., Bocchio, M., Bollmann, Y., Baude, A., and Cossart, R. (2021). CA1 pyramidal cell diversity is rooted in the time of neurogenesis. *ELife* 10, e69270. <https://doi.org/10.7554/eLife.69270>.
- Cembrowski, M.S., and Spruston, N. (2019). Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons. *Nat Rev Neurosci* 20, 193–204. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0125-5>.
- Cembrowski, M.S., Bachman, J.L., Wang, L., Sugino, K., Shields, B.C., and Spruston, N. (2016). Spatial Gene-Expression Gradients Underlie Prominent Heterogeneity of CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* 89, 351–368. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.013>.
- Chattopadhyaya, B., Cristo, G.D., Higashiyama, H., Knott, G.W., Kuhlman, S.J., Welker, E., and Huang, Z.J. (2004). Experience and Activity-Dependent Maturation of Perisomatic GABAergic Innervation in Primary Visual Cortex during a Postnatal Critical Period. *J. Neurosci.* 24, 9598–9611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004>.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C.Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R.D., and Huang, Z.J. (2007). GAD67-Mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron* 54, 889–903. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.015>.
- Che, A., Babij, R., Iannone, A.F., Fetcho, R.N., Ferrer, M., Liston, C., Fishell, G., and De Marco García, N.V. (2018). Layer I Interneurons Sharpen Sensory Maps during Neonatal Development. *Neuron* 99, 98–116.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.002>.
- Chen, H.-H., Hippenmeyer, S., Arber, S., and Frank, E. (2003). Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 96–102. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00006-0).
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Chini, M., Pfeffer, T., and Hanganu-Opatz, I.L. (2021). Developmental increase of inhibition drives decorrelation of neural activity. 2021.07.06.451299. <https://doi.org/10.1101/2021.07.06.451299>.
- Chittajallu, R., Wester, J.C., Craig, M.T., Barksdale, E., Yuan, X.Q., Akgül, G., Fang, C., Collins, D., Hunt, S., Pelkey, K.A., et al. (2017). Afferent specific role of NMDA receptors for the circuit integration of hippocampal neurogliaform cells. *Nat Commun* 8, 152. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00218-y>.
- Claiborne, B.J., Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246, 435–458. <https://doi.org/10.1002/cne.902460403>.
- Colonnese, M.T., Kaminska, A., Minlebaev, M., Milh, M., Bloem, B., Lescure, S., Moriette, G., Chiron, C., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2010). A Conserved Switch in Sensory Processing Prepares Developing Neocortex for Vision. *Neuron* 67, 480–498. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.015>.
- Cope, D.W., Maccaferri, G., Márton, L.F., Roberts, J.D.B., Cobden, P.M., and Somogyi, P. (2002). Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience* 109, 63–80. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00440-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00440-7).

Corner, M. (1985). Ontogeny of brain sleep mechanisms. In *Brain mechanisms of sleep*. In *Ontogeny of Brain Sleep Mechanisms*. In *Brain Mechanisms of Sleep*, pp. 175–197.

Corner, M.A. (1977). Sleep and the beginnings of behavior in the Animal Kingdom—Studies of Ultradian motility cycles in early life. *Progress in Neurobiology* 8, 279–295. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(77\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(77)90008-9).

Cossart, R., and Garel, S. (2022). Step by step: cells with multiple functions in cortical circuit assembly. *Nat Rev Neurosci* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00585-6>.

Cossart, R., and Khazipov, R. (2022). How development sculpts hippocampal circuits and function. *Physiological Reviews* 102, 343–378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2020>.

Crair, M.C. (1999). Neuronal activity during development: permissive or instructive? *Current Opinion in Neurobiology* 9, 88–93. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80011-7).

Crépel, 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.007>.

Dard, R.F., Leprince, E., Denis, J., Rao-Balappa, S., Suchkov, D., Boyce, R., Lopez, C., Giorgi-Kurz, M., Szwagier, T., Dumont, T., et al. (2022). The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion. *BioRxiv* 2021.06.08.447542. <https://doi.org/10.1101/2021.06.08.447542>.

De Felipe, J. (1997). Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cerebral Cortex* 7, 619–634. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.7.619>.

De La Prida, L.M., Bolea, and Sanchez-Andres (1998). Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 10, 899–906. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00097.x>.

De Marco García, N.V., Karayannis, T., and Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 472, 351–355. <https://doi.org/10.1038/nature09865>.

De Marco García, N.V., Priya, R., Tuncdemir, S.N., Fishell, G., and Karayannis, T. (2015). Sensory inputs control the integration of neurogliaform interneurons into cortical circuits. *Nat Neurosci* 18, 393–401. <https://doi.org/10.1038/nn.3946>.

Dehorter, N., Ciceri, G., Bartolini, G., Lim, L., del Pino, I., and Marín, O. (2015). Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch. *Science* 349, 1216–1220. <https://doi.org/10.1126/science.aab3415>.

Del Río, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., et al. (1997). A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70–74. <https://doi.org/10.1038/385070a0>.

Del Rio-Bermudez, C., Kim, J., Sokoloff, G., and Blumberg, M.S. (2020). Active Sleep Promotes Coherent Oscillatory Activity in the Cortico-Hippocampal System of Infant Rats. *Cereb Cortex* 30, 2070–2082. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz223>.

Delcour, M., Russier, M., Castets, F., Turle-Lorenzo, N., Canu, M.-H., Cayetanot, F., Barbe, M.F., and Coq, J.-O. (2018). Early movement restriction leads to maladaptive plasticity in the sensorimotor cortex and to movement disorders. *Sci Rep* 8, 16328. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34312-y>.

- Denis, J., Dard, R.F., Quiroli, E., Cossart, R., and Picardo, M.A. (2020). DeepCINAC: A Deep-Learning-Based Python Toolbox for Inferring Calcium Imaging Neuronal Activity Based on Movie Visualization. *ENeuro* 7. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0038-20.2020>.
- Di Cristo, G., Chattopadhyaya, B., Kuhlman, S.J., Fu, Y., Bélanger, M.-C., Wu, C.Z., Rutishauser, U., Maffei, L., and Huang, Z.J. (2007). Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nature Neuroscience* 10, 1569–1577. <https://doi.org/10.1038/nn2008>.
- Dolleman-Van der Weel, M.J., and Witter, M.P. (2000). Nucleus reuniens thalami innervates γ aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neuroscience Letters* 278, 145–148. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00935-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00935-0).
- Dolleman-Van der Weel, M.J., Silva, F.H.L. da, and Witter, M.P. (1997). Nucleus Reuniens Thalami Modulates Activity in Hippocampal Field CA1 through Excitatory and Inhibitory Mechanisms. *J. Neurosci.* 17, 5640–5650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05640.1997>.
- Dolleman-van der Weel, M.J., Griffin, A.L., Ito, H.T., Shapiro, M.L., Witter, M.P., Vertes, R.P., and Allen, T.A. (2019). The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn. Mem.* 26, 191–205. <https://doi.org/10.1101/lm.048389.118>.
- Donato, F., Jacobsen, R.I., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2017). Stellate cells drive maturation of the entorhinal-hippocampal circuit. *Science* 355, eaai8178. <https://doi.org/10.1126/science.aai8178>.
- Dooley, J.C., and Blumberg, M.S. (2018). Developmental “awakening” of primary motor cortex to the sensory consequences of movement. *ELife* 7, e41841. <https://doi.org/10.7554/eLife.41841>.
- Dooley, J.C., Sokoloff, G., and Blumberg, M.S. (2019). Behavioral states modulate sensory processing in early development. *Curr Sleep Med Rep* 5, 112–117. <https://doi.org/10.1007/s40675-019-00144-z>.
- Dragoi, G., and Tonegawa, S. (2011). Preplay of future place cell sequences by hippocampal cellular assemblies. *Nature* <https://doi.org/10.1038/nature09633>.
- Dragoi, G., and Tonegawa, S. (2013). Distinct preplay of multiple novel spatial experiences in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 9100–9105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306031110>.
- Dragoi, G., and Tonegawa, S. (2014). Selection of preconfigured cell assemblies for representation of novel spatial experiences. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20120522. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0522>.
- Drieu, C., and Zugaro, M. (2019). Hippocampal Sequences During Exploration: Mechanisms and Functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13. .
- Dudok, B., Szoboszlay, M., Paul, A., Klein, P.M., Liao, Z., Hwaun, E., Szabo, G.G., Geiller, T., Vancura, B., Wang, B.-S., et al. (2021a). Recruitment and inhibitory action of hippocampal axo-axonic cells during behavior. *Neuron* 109, 3838–3850.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.033>.
- Dudok, B., Klein, P.M., Hwaun, E., Lee, B.R., Yao, Z., Fong, O., Bowler, J.C., Terada, S., Sparks, F.T., Szabo, G.G., et al. (2021b). Alternating sources of perisomatic inhibition during behavior. *Neuron* 109, 997–1012.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.003>.
- Durand, G.M., Kovalchuk, Y., and Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71–75. <https://doi.org/10.1038/381071a0>.

- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience* <https://doi.org/10.1038/nrn3827>.
- Eichenbaum, H. (2017). On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron* *95*, 1007–1018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.036>.
- Enander, J.M.D., Jones, A.M., Kirkland, M., Hurless, J., Jörntell, H., and Loeb, G.E. (2022). A model for self-organization of sensorimotor function: the spinal monosynaptic loop. *Journal of Neurophysiology* *127*, 1460–1477. <https://doi.org/10.1152/jn.00242.2021>.
- Erzurumlu, R.S., and Gaspar, P. (2012). Development and Critical Period Plasticity of the Barrel Cortex. *Eur J Neurosci* *35*, 1540–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x>.
- Erzurumlu, R.S., and Gaspar, P. (2020). How the Barrel Cortex Became a Working Model for Developmental Plasticity: A Historical Perspective. *J. Neurosci.* *40*, 6460–6473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0582-20.2020>.
- Evans, M.H., Petersen, R.S., and Humphries, M.D. (2019). On the use of calcium deconvolution algorithms in practical contexts (Neuroscience).
- Fagiolini, M., and Hensch, T.K. (2000). Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* *404*, 183–186. <https://doi.org/10.1038/35004582>.
- Farooq, U., and Dragoi, G. (2019). Emergence of preconfigured and plastic time-compressed sequences in early postnatal development. *Science* *363*, 168–173. <https://doi.org/10.1126/science.aav0502>.
- Feller, M.B., and Kerschensteiner, D. (2020). Retinal waves and their role in visual system development. In *Synapse Development and Maturation*, (Elsevier), pp. 367–382.
- Feng, T., Alicea, C., Pham, V., Kirk, A., and Pieraut, S. (2021). Experience-Dependent Inhibitory Plasticity Is Mediated by CCK+ Basket Cells in the Developing Dentate Gyrus. *J. Neurosci.* *41*, 4607–4619. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1207-20.2021>.
- Ferrer, C., and De Marco García, N.V. (2022). The Role of Inhibitory Interneurons in Circuit Assembly and Refinement Across Sensory Cortices. *Front Neural Circuits* *16*, 866999. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.866999>.
- Foote, S.L., and Morrison, J.H. (1987). Chapter 15 Development of the Noradrenergic, Serotonergic, and Dopaminergic Innervation of Neocortex. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 391–423.
- Fortin, N.J., Agster, K.L., and Eichenbaum, H.B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci* *5*, 458–462. <https://doi.org/10.1038/nn834>.
- Freund, T. f., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* *6*, 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I).
- Gallo, N.B., Berisha, A., and Van Aelst, L. (2022). Microglia regulate chandelier cell axo-axonic synaptogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *119*, e2114476119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114476119>.
- Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J., and Konnerth, A. (2000). Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* *3*, 452–459. <https://doi.org/10.1038/74823>.
- Gauthier, J.L., Koay, S.A., Nieh, E.H., Tank, D.W., Pillow, J.W., and Charles, A.S. (2018). Detecting and Correcting False Transients in Calcium Imaging (Neuroscience).

- Ge, X., Zhang, K., Gribizis, A., Hamodi, A.S., Sabino, A.M., and Crair, M.C. (2021). Retinal waves prime visual motion detection by simulating future optic flow. *Science* 373, eabd0830. <https://doi.org/10.1126/science.abd0830>.
- Geiller, T., Sadeh, S., Rolotti, S.V., Blockus, H., Vancura, B., Negrean, A., Murray, A.J., Rózsa, B., Polleux, F., Clopath, C., et al. (2022). Local circuit amplification of spatial selectivity in the hippocampus. *Nature* 601, 105–109. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04169-9>.
- Giovannucci, A., Friedrich, J., Gunn, P., Kalfon, J., Koay, S.A., Taxidis, J., Najafi, F., Gauthier, J.L., Zhou, P., Tank, D.W., et al. (2018). CaImAn: An open source tool for scalable Calcium Imaging data Analysis. *BioRxiv* 339564. <https://doi.org/10.1101/339564>.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugaro, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12, 1222–1223. <https://doi.org/10.1038/nn.2384>.
- Glærum, I.L., Dunville, K., Montaldo, N.P., Kirikae, H., Nigro, M.J., Sætrom, P., Loon, B. van, and Quattrocchio, G. (2022). Persistence of Cajal-Retzius cells in the postnatal hippocampus is required for development of dendritic spines of CA1 pyramidal cells. *BioRxiv* 2022.05.09.491146. <https://doi.org/10.1101/2022.05.09.491146>.
- Gomez-Di Cesare, C.M., Smith, K.L., Rice, F.L., and Swann, J.W. (1997). Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 384, 165–180. .
- Gordon, A., and Stryker, M.P. (1996). Plasticity of Binocular Responses in the. *The Journal of Neuroscience* 13. .
- Gour, A., Boergens, K.M., Heike, N., Hua, Y., Laserstein, P., Song, K., and Helmstaedter, M. (2021). Postnatal connectomic development of inhibition in mouse barrel cortex. *Science* 371. <https://doi.org/10.1126/science.abb4534>.
- Graf, J., Zhang, C., Marguet, S.L., Herrmann, T., Flossmann, T., Hinsch, R., Rahmati, V., Guenther, M., Frahm, C., Urbach, A., et al. (2021a). A limited role of NKCC1 in telencephalic glutamatergic neurons for developing hippocampal network dynamics and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2014784118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014784118>.
- Graf, J., Rahmati, V., Majoros, M., Witte, O.W., Geis, C., Kiebel, S.J., Holthoff, K., and Kirmse, K. (2021b). Network instability dynamics drive a transient bursting period in the developing hippocampus in vivo. *BioRxiv* 2021.05.28.446133. <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446133>.
- Gramsbergen, A., Schwartze, P., and Prechtl, H.F.R. (1970). The postnatal development of behavioral states in the rat. *Developmental Psychobiology* 3, 267–280. <https://doi.org/10.1002/dev.420030407>.
- Haimerl, C., Angulo-Garcia, D., Villette, V., Reichinnek, S., Torcini, A., Cossart, R., and Malvache, A. (2019). Internal representation of hippocampal neuronal population spans a time-distance continuum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 7477–7482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718518116>.
- Hamburger, V. (1973). Anatomical and Physiological Basis of Embryonic Motility in Birds and Mammals. In *Studies on the Development of Behavior and the Nervous System*, (Elsevier), pp. 51–76.
- Hamburger, V., Wenger, E., and Oppenheim, R. (1966). Motility in the chick embryo in the absence of sensory input. *J. Exp. Zool.* 162, 133–159. <https://doi.org/10.1002/jez.1401620202>.
- Hartung, H., Brockmann, M.D., Pöschel, B., Feo, V.D., and Hanganu-Opatz, I.L. (2016). Thalamic and Entorhinal Network Activity Differently Modulates the Functional Development of Prefrontal–

- Hippocampal Interactions. *J. Neurosci.* 36, 3676–3690. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3232-15.2016>.
- Hensch, T.K. (2004). Critical Period Regulation. *Annual Review of Neuroscience* 27, 549–579. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327>.
- Hensch, T.K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6, 877–888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>.
- Hjorth-Simonsen, A. (1972). Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *Journal of Comparative Neurology* 146, 219–231. <https://doi.org/10.1002/cne.901460206>.
- Hjorth-Simonsen, A., and Jeune, B. (1972). Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *Journal of Comparative Neurology* 144, 215–231. <https://doi.org/10.1002/cne.901440206>.
- Horton, N.G., Wang, K., Kobat, D., Clark, C.G., Wise, F.W., Schaffer, C.B., and Xu, C. (2013). In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photon* 7, 205–209. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336>.
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., and Tonegawa, S. (1999). BDNF Regulates the Maturation of Inhibition and the Critical Period of Plasticity in Mouse Visual Cortex. *Cell* 98, 739–755. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81509-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81509-3).
- Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *The Journal of Physiology* 206, 419–436. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009022>.
- Huszár, R., Zhang, Y., Blockus, H., and Buzsáki, G. (2022). Preconfigured dynamics in the hippocampus are guided by embryonic birthdate and rate of neurogenesis. 2022.05.07.491015. <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.491015>.
- Inácio, A.R., Nasretudinov, A., Lebedeva, J., and Khazipov, R. (2016). Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord. *Nat Commun* 7, 13060. <https://doi.org/10.1038/ncomms13060>.
- Inan, M., Blázquez-Llorca, L., Merchán-Pérez, A., Anderson, S.A., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2013). Dense and Overlapping Innervation of Pyramidal Neurons by Chandelier Cells. *J Neurosci* 33, 1907–1914. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4049-12.2013>.
- Ito, H.T., Zhang, S.-J., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2015). A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* 522, 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature14396>.
- Iwai, Y., Fagiolini, M., Obata, K., and Hensch, T.K. (2003). Rapid Critical Period Induction by Tonic Inhibition in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 23, 6695–6702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06695.2003>.
- Jacobsen, R.I., Nair, R.R., Obenhaus, H.A., Donato, F., Slettmoen, T., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2021). All-viral tracing of monosynaptic inputs to single birthdate-defined neurons in the intact brain. 2021.10.18.464781. <https://doi.org/10.1101/2021.10.18.464781>.
- Jouvet-Mounier, D., Astic, L., and Lacote, D. (1969). Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Developmental Psychobiology* 2, 216–239. <https://doi.org/10.1002/dev.420020407>.

- Karlsson, K.Æ., Mohns, E.J., Viana di Prisco, G., and Blumberg, M.S. (2006). ON THE CO-OCCURRENCE OF STARTLES AND HIPPOCAMPAL SHARP WAVES IN NEWBORN RATS. *Hippocampus* 16, 959–965. <https://doi.org/10.1002/hipo.20224>.
- Katona, I., Acsády, L., and Freund, T.F. (1999). Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88, 37–55. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00302-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00302-9).
- Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W., and Hama, K. (1988). Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 72, 347–362. <https://doi.org/10.1007/BF00250256>.
- Katz, L.C., and Shatz, C.J. (1996). Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science* 274, 1133–1138. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1133>.
- Kawaguchi, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex* 7, 476–486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>.
- Keller, G.B., and Mrsic-Flogel, T.D. (2018). Predictive Processing: A Canonical Cortical Computation. *Neuron* 100, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.003>.
- Keller, G.B., Bonhoeffer, T., and Hübener, M. (2012). Sensorimotor Mismatch Signals in Primary Visual Cortex of the Behaving Mouse. *Neuron* 74, 809–815. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.040>.
- Kepecs, A., and Fishell, G. (2014). Interneuron Cell Types: Fit to form and formed to fit. *Nature* 505, 318–326. <https://doi.org/10.1038/nature12983>.
- Khazipov, R., and Luhmann, H.J. (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends in Neurosciences* 29, 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.05.007>.
- Khazipov, R., and Milh, M. (2018). Early patterns of activity in the developing cortex: Focus on the sensorimotor system. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 76, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.014>.
- Khazipov, R., Congar, P., and Ben-Ari, Y. (1995). Hippocampal CA1 lacunosum-molecular interneurons: comparison of effects of anoxia on excitatory and inhibitory postsynaptic currents. *Journal of Neurophysiology* 74, 2138–2149. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.5.2138>.
- Khazipov, R., Sirota, A., Leinekugel, X., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y., and Buzsáki, G. (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432, 758–761. <https://doi.org/10.1038/nature03132>.
- Kilb, W., Kirischuk, S., and Luhmann, H.J. (2011). Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. *European Journal of Neuroscience* 34, 1677–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07878.x>.
- Kim, J.-Y., Ash, R.T., Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Golde, T.E., Smirnakis, S.M., and Jankowsky, J.L. (2013). Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualizing and manipulating neuronal circuits in vivo. *Eur J Neurosci* 37, 1203–1220. <https://doi.org/10.1111/ejn.12126>.
- Kim, J.-Y., Grunke, S.D., Levites, Y., Golde, T.E., and Jankowsky, J.L. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J Vis Exp* <https://doi.org/10.3791/51863>.

Klausberger, T., Magill, P.J., Márton, L.F., Roberts, J.D.B., Cobden, P.M., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421, 844–848. <https://doi.org/10.1038/nature01374>.

Klausberger, T., Márton, L.F., Baude, A., Roberts, J.D.B., Magill, P.J., and Somogyi, P. (2004). Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7, 41–47. <https://doi.org/10.1038/nn1159>.

Knierim, J.J., Kudrimoti, H.S., and McNaughton, B.L. (1998). Interactions Between Idiothetic Cues and External Landmarks in the Control of Place Cells and Head Direction Cells. *Journal of Neurophysiology* 80, 425–446. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.425>.

Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.-Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., et al. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci* 17, 269–279. <https://doi.org/10.1038/nn.3614>.

Kreider, J.C., and Blumberg, M.S. (2000). Mesopontine contribution to the expression of active ‘twitch’ sleep in decerebrate week-old rats. *Brain Research* 872, 149–159. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02518-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02518-X).

Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M., and Kawaguchi, Y. (2016). The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses. *Frontiers in Neural Circuits* 10. .

Lebovitz, R.M., Dichter, M., and Spencer, W.A. (1971). Recurrent Excitation In The Ca3 Region of Cat Hippocampus. *International Journal of Neuroscience* 2, 99–107. <https://doi.org/10.3109/00207457109146996>.

Lee, S.-H., and Dan, Y. (2012). Neuromodulation of Brain States. *Neuron* 76, 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.012>.

Lee, S.-H., Marchionni, I., Bezaire, M., Varga, C., Danielson, N., Lovett-Barron, M., Losonczy, A., and Soltesz, I. (2014). Parvalbumin-Positive Basket Cells Differentiate among Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron* 82, 1129–1144. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.034>.

Leighton, A.H., and Lohmann, C. (2016). The Wiring of Developing Sensory Circuits—From Patterned Spontaneous Activity to Synaptic Plasticity Mechanisms. *Frontiers in Neural Circuits* 10. .

Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., and Buzsáki, G. (2002). Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo. *Science* 296, 2049–2052. <https://doi.org/10.1126/science.1071111>.

Leprince, E. (2021). Modulation de la dynamique de la région de CA1 par des afférences extra-hippocampiques durant le développement. These en préparation. Aix-Marseille.

Leprince, E., Dard, R.F., Mortet, S., Filippi, C., Giorgi-Kurz, M., Lenck-Santini, P.-P., Picardo, M.A., Bocchio, M., Baude, A., and Cossart, R. (2022). Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.06.03.494656>.

Levitt, P., and Moore, R.Y. (1979). DEVELOPMENT OF THE NORADRENERGIC INNERVATION OF NEOCORTEX. 17. .

Li, X.-G., Somogyi, P., Tepper, J.M., and Buzsáki, G. (1992). Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90. <https://doi.org/10.1007/BF00230934>.

- Lorente De Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal Für Psychologie Und Neurologie* 46, 113–177. .
- Luhmann, H.J., and Khazipov, R. (2018). Neuronal Activity Patterns in the Developing Barrel Cortex. *Neuroscience* 368, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.025>.
- Luhmann, H.J., Sinning, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Stüttgen, M.C., Kirischuk, S., and Kilb, W. (2016). Spontaneous Neuronal Activity in Developing Neocortical Networks: From Single Cells to Large-Scale Interactions. *Frontiers in Neural Circuits* 10. .
- Maccaferri, G., David, J., Roberts, B., Szucs, P., Cottingham, C.A., and Somogyi, P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *The Journal of Physiology* 524, 91–116. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00091.x>.
- Malvache, A., Reichinnek, S., Villette, V., Haimerl, C., and Cossart, R. (2016). Awake hippocampal reactivations project onto orthogonal neuronal assemblies. *Science* 353, 1280–1283. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3319>.
- Maravall, M., Stern, E.A., and Svoboda, K. (2004). Development of Intrinsic Properties and Excitability of Layer 2/3 Pyramidal Neurons During a Critical Period for Sensory Maps in Rat Barrel Cortex. *Journal of Neurophysiology* 92, 144–156. <https://doi.org/10.1152/jn.00598.2003>.
- Marissal, T., Bonifazi, P., Picardo, M.A., Nardou, R., Petit, L.F., Baude, A., Fishell, G.J., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2012). Pioneer glutamatergic cells develop into a morpho-functionally distinct population in the juvenile CA3 hippocampus. *Nat Commun* 3, 1316. <https://doi.org/10.1038/ncomms2318>.
- Marques, H.G., Imtiaz, F., Iida, F., and Pfeifer, R. (2013). Self-organization of reflexive behavior from spontaneous motor activity. *Biol Cybern* 107, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s00422-012-0521-7>.
- Marty, S., Wehrlé, R., Alvarez-Leefmans, F.J., Gasnier, B., and Sotelo, C. (2002). Postnatal maturation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis: Maturation of NKCC immunoreactivity and inhibitory synapses. *European Journal of Neuroscience* 15, 233–245. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01854.x>.
- Masurkar, A.V., Srinivas, K.V., Brann, D.H., Warren, R., Lowes, D.C., and Siegelbaum, S.A. (2017). Medial and Lateral Entorhinal Cortex Differentially Excite Deep versus Superficial CA1 Pyramidal Neurons. *Cell Reports* 18, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.012>.
- McBain, C.J., DiChiara, T.J., and 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-07-04433.1994>.
- McKenzie, S., Huszár, R., English, D.F., Kim, K., Yoon, E., and Buzsáki, G. (2019). Preexisting hippocampal network dynamics constrain optogenetically induced place fields. *BioRxiv* 803577. <https://doi.org/10.1101/803577>.
- McVea, D.A., Mohajerani, M.H., and Murphy, T.H. (2012). Voltage-Sensitive Dye Imaging Reveals Dynamic Spatiotemporal Properties of Cortical Activity after Spontaneous Muscle Twitches in the Newborn Rat. *J. Neurosci.* 32, 10982–10994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1322-12.2012>.
- Meyniel, F., Maheu, M., and Dehaene, S. (2016). Human Inferences about Sequences: A Minimal Transition Probability Model. *PLOS Computational Biology* 12, e1005260. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005260>.

- Miles, R., and Wong, R.K. (1986). Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *The Journal of Physiology* 373, 397–418. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016055>.
- Miles, R., Le Duigou, C., Simonnet, J., Telenczuk, M., and Fricker, D. (2014). Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. .
- Miller, M.W. (1986). Maturation of Rat Visual Cortex. III. Postnatal Morphogenesis and Synaptogenesis of Local Circuit Neurons. 15. .
- Minlebaev, M., Colonnese, M., Tsintsadze, T., Sirota, A., and Khazipov, R. (2011). Early Gamma Oscillations Synchronize Developing Thalamus and Cortex. *Science* 334, 226–229. <https://doi.org/10.1126/science.1210574>.
- Modol, L., Sousa, V.H., Malvache, A., Tressard, T., Baude, A., and Cossart, R. (2017). Spatial Embryonic Origin Delineates GABAergic Hub Neurons Driving Network Dynamics in the Developing Entorhinal Cortex. *Cerebral Cortex* 27, 4649–4661. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx198>.
- Modol, L., Bollmann, Y., Tressard, T., Baude, A., Che, A., Duan, Z.R.S., Babij, R., De Marco García, N.V., and Cossart, R. (2020). Assemblies of Perisomatic GABAergic Neurons in the Developing Barrel Cortex. *Neuron* 105, 93–105.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.007>.
- Mohajerani, M.H., Sivakumaran, S., Zacchi, P., Aguilera, P., and Cherubini, E. (2007). Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 13176–13181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704533104>.
- Mohns, E.J., and Blumberg, M.S. (2008). Synchronous bursts of neuronal activity in the developing hippocampus: Modulation by active sleep, and association with emerging gamma and theta rhythms. *J Neurosci* 28, 10134–10144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1967-08.2008>.
- Mohns, E.J., and Blumberg, M.S. (2010). Neocortical Activation of the Hippocampus during Sleep in Infant Rats. *Journal of Neuroscience* 30, 3438–3449. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4832-09.2010>.
- Morales, B., Choi, S.-Y., and Kirkwood, A. (2002). Dark Rearing Alters the Development of GABAergic Transmission in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 22, 8084–8090. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-08084.2002>.
- Morozov, Y.M., and Freund, T.F. (2003). Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 120, 923–939. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00409-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00409-3).
- Muessig, L., Lasek, M., Varsavsky, I., Cacucci, F., and Wills, T.J. (2019). Coordinated Emergence of Hippocampal Replay and Theta Sequences during Post-natal Development. *Current Biology* 29, 834–840.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.005>.
- Murata, Y., and Colonnese, M.T. (2020). GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Science Advances* 6, eaba1430. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1430>.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137–141. <https://doi.org/10.1038/84397>.
- Nitsch, R., Soriano, E., and Frotscher, M. (1990). The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryol* 181, 413–425. <https://doi.org/10.1007/BF02433788>.

O’Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34, 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1).

Oliva, A.A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., and Swann, J.W. (2000). Novel Hippocampal Interneuron Subtypes Identified Using Transgenic Mice That Express Green Fluorescent Protein in GABAergic Interneurons. *J. Neurosci.* 20, 3354–3368. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-09-03354.2000>.

Ouzounov, D.G., Wang, T., Wang, M., Feng, D.D., Horton, N.G., Cruz-Hernández, J.C., Cheng, Y.-T., Reimer, J., Tolias, A.S., Nishimura, N., et al. (2017). In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. *Nat Methods* 14, 388–390. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4183>.

Ouzounov, D.G., Wang, T., Wu, C., and Xu, C. (2019). GCaMP6 㥏/F dependence on the excitation wavelength in 3-photon and 2-photon microscopy of mouse brain activity. *Biomed. Opt. Express*, BOE 10, 3343–3352. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.003343>.

Pachitariu, M., Stringer, C., Dipoppa, M., Schröder, S., Rossi, L.F., Dalgleish, H., Carandini, M., and Harris, K.D. (2017). Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *BioRxiv* 061507. <https://doi.org/10.1101/061507>.

Pan-Vazquez, A., Wefelmeyer, W., Gonzalez Sabater, V., Neves, G., and Burrone, J. (2020). Activity-Dependent Plasticity of Axo-axonic Synapses at the Axon Initial Segment. *Neuron* 106, 265-276.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.037>.

Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., and Buzsáki, G. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321, 1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>.

Paul, A., Crow, M., Raudales, R., He, M., Gillis, J., and Huang, Z.J. (2017). Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity. *Cell* 171, 522-539.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.032>.

Peever, J., and Fuller, P.M. (2017). The Biology of REM Sleep. *Current Biology* 27, R1237–R1248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.026>.

Pelkey, K.A., Chittajallu, R., Craig, M.T., Tricoire, L., Wester, J.C., and McBain, C.J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev* 97, 1619–1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>.

Penn, A.A., Riquelme, P.A., Feller, M.B., and Shatz, C.J. (1998). Competition in Retinogeniculate Patterning Driven by Spontaneous Activity. *Science* 279, 2108–2112. <https://doi.org/10.1126/science.279.5359.2108>.

Petersson, P., Waldenström, A., Fåhræus, C., and Schouenborg, J. (2003). Spontaneous muscle twitches during sleep guide spinal self-organization. *Nature* 424, 72–75. <https://doi.org/10.1038/nature01719>.

Picardo, M.A., Guigue, P., Bonifazi, P., Batista-Brito, R., Allene, C., Ribas, A., Fishell, G., Baude, A., and Cossart, R. (2011). Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* 71, 695–709. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.018>.

Pnevmatikakis, E.A., Soudry, D., Gao, Y., Machado, T.A., Merel, J., Pfau, D., Reardon, T., Mu, Y., Lacefield, C., Yang, W., et al. (2016). Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data. *Neuron* 89, 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.037>.

- Price, C.J. (2005). Neurogliaform Neurons Form a Novel Inhibitory Network in the Hippocampal CA1 Area. *Journal of Neuroscience* 25, 6775–6786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1135-05.2005>.
- Price, C.J., Scott, R., Rusakov, D.A., and Capogna, M. (2008). GABAB Receptor Modulation of Feedforward Inhibition through Hippocampal Neurogliaform Cells. *Journal of Neuroscience* 28, 6974–6982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-07.2008>.
- Quattrocchio, G., and Maccaferri, G. (2013). Novel GABAergic Circuits Mediating Excitation/Inhibition of Cajal-Retzius Cells in the Developing Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 33, 5486–5498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-12.2013>.
- Quattrocchio, G., and Maccaferri, G. (2014). Optogenetic Activation of Cajal-Retzius Cells Reveals Their Glutamatergic Output and a Novel Feedforward Circuit in the Developing Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* 34, 13018–13032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1407-14.2014>.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'Homme et des vertébrés*. Maloine (Paris) 2, 891–942. .
- Ringach, D.L. (2009). Spontaneous and driven cortical activity: implications for computation. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.07.005>.
- Rio-Bermudez, C.D., Sokoloff, G., and Blumberg, M.S. (2015). Sensorimotor Processing in the Newborn Rat Red Nucleus during Active Sleep. *J. Neurosci.* 35, 8322–8332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0564-15.2015>.
- Robertson, S.S., and Smotherman, W.P. (1990). The neural control of cyclic motor activity in the fetal rat (*Rattus norvegicus*). *Physiology & Behavior* 47, 121–126. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90049-A](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90049-A).
- Robinson, N.T.M., Descamps, L.A.L., Russell, L.E., Buchholz, M.O., Bicknell, B.A., Antonov, G.K., Lau, J.Y.N., Nutbrown, R., Schmidt-Hieber, C., and Häusser, M. (2020). Targeted Activation of Hippocampal Place Cells Drives Memory-Guided Spatial Behavior. *Cell* 183, 1586-1599.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.061>.
- Robinson, S.R., Blumberg, M.S., Lane, M.S., and Kreber, L.A. (2000). Spontaneous Motor Activity in Fetal and Infant Rats Is Organized Into Discrete Multilimb Bouts. *Behavioral Neuroscience* 9. .
- Roffwarg, H.P., Muzio, J.N., and Dement, W.C. (1966). Ontogenetic Development of the Human Sleep-Dream Cycle. *Science* 152, 604–619. <https://doi.org/10.1126/science.152.3722.604>.
- Rübel, O., Tritt, A., Ly, R., Dichter, B.K., Ghosh, S., Niu, L., Soltesz, I., Svoboda, K., Frank, L., and Bouchard, K.E. (2022). The Neurodata Without Borders ecosystem for neurophysiological data science. *BioRxiv* 2021.03.13.435173. <https://doi.org/10.1101/2021.03.13.435173>.
- Rubenstein, J., and Rakic, P. (2013). *Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections: Comprehensive Developmental Neuroscience* (Academic Press).
- Sanders, M.J., Wiltgen, B.J., and Fanselow, M.S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology* 463, 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01283-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01283-4).
- Save, E., Nerad, L., and Poucet, B. (2000). Contribution of multiple sensory information to place field stability in hippocampal place cells. *Hippocampus* 10, 64–76. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<64::AID-HIPO7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<64::AID-HIPO7>3.0.CO;2-Y).

Schneider, S., Lee, J.H., and Mathis, M.W. (2022). Learnable latent embeddings for joint behavioral and neural analysis (arXiv).

Schouenborg, J. (2008). Action-based sensory encoding in spinal sensorimotor circuits. *Brain Research Reviews* 57, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.007>.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11–21. .

Sehara, K., and Kawasaki, H. (2011). Neuronal Circuits with Whisker-Related Patterns. *Mol Neurobiol* 43, 155–162. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8170-8>.

Shepherd, G.M.G., and Harris, K.M. (1998). Three-Dimensional Structure and Composition of CA3→CA1 Axons in Rat Hippocampal Slices: Implications for Presynaptic Connectivity and Compartmentalization. *J. Neurosci.* 18, 8300–8310. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-20-08300.1998>.

Siegle, J.H., Ledochowitsch, P., Jia, X., Millman, D.J., Ocker, G.K., Caldejon, S., Casal, L., Cho, A., Denman, D.J., Durand, S., et al. (2021). Reconciling functional differences in populations of neurons recorded with two-photon imaging and electrophysiology. *ELife* 10, e69068. <https://doi.org/10.7554/eLife.69068>.

Slomianka, L., Amrein, I., Knuesel, I., Sørensen, J.C., and Wolfer, D.P. (2011). Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct Funct* 216, 301. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0322-0>.

Soltesz, I., and Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nat Neurosci* 21, 484–493. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0118-0>.

Sommeijer, J.-P., and Levelt, C.N. (2012). Synaptotagmin-2 Is a Reliable Marker for Parvalbumin Positive Inhibitory Boutons in the Mouse Visual Cortex. *PLOS ONE* 7, e35323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035323>.

Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology* 562, 9–26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915>.

Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A., and Smith, A.D. (1983). A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Research* 259, 137–142. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91076-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91076-4).

Stark, E., Roux, L., Eichler, R., Senzai, Y., Royer, S., and Buzsáki, G. (2014). Pyramidal Cell-Interneuron Interactions Underlie Hippocampal Ripple Oscillations. *Neuron* 83, 467–480. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.023>.

Steinecke, A., Hozhabri, E., Tapanes, S., Ishino, Y., Zeng, H., Kamasawa, N., and Taniguchi, H. (2017). Neocortical Chandelier Cells Developmentally Shape Axonal Arbors through Reorganization but Establish Subcellular Synapse Specificity without Refinement. *ENeuro* 4, ENEURO.0057-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0057-17.2017>.

Stellwagen, D., and Shatz, C.J. (2002). An Instructive Role for Retinal Waves in the Development of Retinogeniculate Connectivity. *Neuron* 33, 357–367. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00577-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00577-9).

- van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10, 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>.
- Stringer, C., Pachitariu, M., Steinmetz, N., Reddy, C.B., Carandini, M., and Harris, K.D. (2019). Spontaneous behaviors drive multidimensional, brainwide activity. *Science* 364, 255–255. <https://doi.org/10.1126/science.aav7893>.
- Stryker, M., and Harris, W. (1986). Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6, 2117–2133. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-08-02117.1986>.
- Su, J., Basso, D., Iyer, S., Su, K., Wei, J., and Fox, M.A. (2020). Paracrine Role for Somatostatin Interneurons in the Assembly of Perisomatic Inhibitory Synapses. *J. Neurosci.* 40, 7421–7435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0613-20.2020>.
- Supèr, H., and Soriano, E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI: DEVELOPMENT OF HIPPOCAMPAL CONNECTIONS. *Journal of Comparative Neurology* 344, 101–120. <https://doi.org/10.1002/cne.903440108>.
- Szabo, G.G., Farrell, J.S., Dudok, B., Hou, W.-H., Ortiz, A.L., Varga, C., Moolchand, P., Gulsever, C.I., Gschwind, T., Dimidschstein, J., et al. (2022). Ripple-selective GABAergic projection cells in the hippocampus. *Neuron* S0896627322003105. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.04.002>.
- Tiriac, A., and Blumberg, M.S. (2016). Gating of refference in the external cuneate nucleus during self-generated movements in wake but not sleep. *ELife* 5, e18749. <https://doi.org/10.7554/eLife.18749>.
- Tiriac, A., Uitermarkt, B.D., Fanning, A.S., Sokoloff, G., and Blumberg, M.S. (2012). Rapid Whisker Movements in Sleeping Newborn Rats. *Current Biology* 22, 2075–2080. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.009>.
- Tiriac, A., Del Rio-Bermudez, C., and Blumberg, M.S. (2014). Self-generated movements with “unexpected” sensory consequences. *Curr. Biol.* 24, 2136–2141. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.053>.
- Tolman, E.C. (1948). COGNITIVE MAPS IN RATS AND MEN. *Psychological Review* 55, 189–208. <https://doi.org/10.1037/h0061626>.
- Tolman, E.C., Ritchie, B.F., and Kalish, D. (1946). Studies in spatial learning. II. Place learning versus response learning. *Journal of Experimental Psychology* 36, 221–229. <https://doi.org/10.1037/h0060262>.
- Tricoire, L., Pelkey, K.A., Erkkila, B.E., Jeffries, B.W., Yuan, X., and McBain, C.J. (2011). A Blueprint for the Spatiotemporal Origins of Mouse Hippocampal Interneuron Diversity. *J. Neurosci.* 31, 10948–10970. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0323-11.2011>.
- Valeeva, G., Janackova, S., Nasretdinov, A., Rychkova, V., Makarov, R., Holmes, G.L., Khazipov, R., and Lenck-Santini, P.-P. (2019). Emergence of Coordinated Activity in the Developing Entorhinal–Hippocampal Network. *Cerebral Cortex* 29, 906–920. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy309>.
- Van der Loos, H., and Woolsey, T.A. (1973). Somatosensory Cortex: Structural Alterations following Early Injury to Sense Organs. *Science* 179, 395–398. <https://doi.org/10.1126/science.179.4071.395>.
- Vertes, R.P. (1984). Brainstem control of the events of rem sleep. *Progress in Neurobiology* 22, 241–288. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(84\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(84)90020-0).

- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., and Leranth, C. (2007). Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Research Bulletin* 71, 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.12.002>.
- Vida, I., Halasy, K., Szinyei, C., Somogyi, P., and 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. *The Journal of Physiology* 506, 755–773. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.755bv.x>.
- Villette, V., Malvache, A., Tressard, T., Dupuy, N., and Cossart, R. (2015). Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information. *Neuron* 88, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.052>.
- Villette, V., Guigue, P., Picardo, M.A., Sousa, V.H., Leprince, E., Lachamp, P., Malvache, A., Tressard, T., Cossart, R., and Baude, A. (2016). Development of early-born γ -Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood. *J Comp Neurol* 524, 2440–2461. <https://doi.org/10.1002/cne.23961>.
- Vinck, M., Batista-Brito, R., Knoblich, U., and Cardin, J.A. (2015). Arousal and Locomotion Make Distinct Contributions to Cortical Activity Patterns and Visual Encoding. *Neuron* 86, 740–754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.028>.
- Viney, T.J., Lasztocki, B., Katona, L., Crump, M.G., Tukker, J.J., Klausberger, T., and Somogyi, P. (2013). Network state-dependent inhibition of identified hippocampal CA3 axo-axonic cells in vivo. *Nat Neurosci* 16, 1802–1811. <https://doi.org/10.1038/nn.3550>.
- Wei, Z., Lin, B.-J., Chen, T.-W., Daie, K., Svoboda, K., and Druckmann, S. (2020). A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology. *PLOS Computational Biology* 16, e1008198. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008198>.
- Wen, J.A., and Barth, A.L. (2011). Input-Specific Critical Periods for Experience-Dependent Plasticity in Layer 2/3 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 31, 4456–4465. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6042-10.2011>.
- Witter, M.P. (1993). Organization of the entorhinal—hippocampal system: A review of current anatomical data. *Hippocampus* 3, 33–44. <https://doi.org/10.1002/hipo.1993.4500030707>.
- Witter, M.P., Wouterlood, F.G., Naber, P.A., and Van Haften, T. (2006). Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x>.
- Witter, M.P., Kleven, H., and Kobro Flatmoen, A. (2017). Comparative Contemplations on the Hippocampus. *Brain Behav Evol* 90, 15–24. <https://doi.org/10.1159/000475703>.
- Wong, F.K., Bercsenyi, K., Sreenivasan, V., Portalés, A., Fernández-Otero, M., and Marín, O. (2018). Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* 557, 668–673. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0139-6>.
- Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research* 17, 205–242. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90079-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90079-X).
- Xu, H., Furman, M., Mineur, Y.S., Chen, H., King, S.L., Zenisek, D., Zhou, Z.J., Butts, D.A., Tian, N., Picciotto, M.R., et al. (2011). An Instructive Role for Patterned Spontaneous Retinal Activity in Mouse Visual Map Development. *Neuron* 70, 1115–1127. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.028>.

Yamamoto, N., and López-Bendito, G. (2012). Shaping brain connections through spontaneous neural activity. *European Journal of Neuroscience* 35, 1595–1604. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08101.x>.

Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2016). Spindle Bursts in Neonatal Rat Cerebral Cortex. *Neural Plasticity* 2016, e3467832. <https://doi.org/10.1155/2016/3467832>.

Zhang, S.-J., Ye, J., Couey, J.J., Witter, M., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2014). Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20120516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0516>.