



HAL
open science

Caractérisation multiparamétrique des neurones du hilus du gyrus denté chez la souris

Clémence Leclerc

► **To cite this version:**

Clémence Leclerc. Caractérisation multiparamétrique des neurones du hilus du gyrus denté chez la souris. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66411 . tel-00833326

HAL Id: tel-00833326

<https://theses.hal.science/tel-00833326v1>

Submitted on 12 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS VI

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole Doctorale Cerveau Cognition Comportement

Présentée et soutenue publiquement par

Clémence LECLERC

Le 12 Octobre 2012

**Caractérisation multiparamétrique des neurones
du hilus du gyrus denté chez la souris**

Jury

Pr. Stéphane CHARPIER
Dr. Thierry GALLOPIN
Dr. Claire RAMPON
Dr. Valérie CREPEL
Dr. Paul SALIN
Dr. Serge MARTY

Président
Directeur de thèse
Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

RESUME

Le gyrus denté fait partie de la formation hippocampique et joue un rôle clé notamment dans le traitement des informations spatiales et les processus mnésiques. Il est également l'une des rares régions cérébrales où la neurogénèse a lieu de manière constitutive chez le mammifère adulte.

Le gyrus denté est composé de nombreux types neuronaux. Les cellules granulaires confinées dans la couche granulaire ainsi que les cellules moussues du hilus sont les principales cellules glutamatergiques du gyrus denté et sont relativement homogènes de part leur propriétés intrinsèques. Le hilus est également peuplé d'interneurones GABAergiques qui se caractérisent par leur grande diversité. Ces interneurones représentent des acteurs cruciaux dans la balance excitation/inhibition du réseau hippocampique et ils sont impliqués dans diverses conditions neuropathologiques telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, l'ischémie, le traumatisme crânien, le stress chronique... Cependant, de part leur hétérogénéité, ces interneurones restent assez peu décrits et les corrélations entre les classifications existantes sont difficiles à établir. Une meilleure connaissance des populations neuronales qui composent le hilus devrait contribuer à éclaircir leurs rôles spécifiques.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la localisation et la répartition dans le hilus des interneurones GABAergiques par rapport aux neurones glutamatergiques. Pour ce faire nous avons utilisé des souris transgéniques GAD_{67} -GFP et évalué les densités de neurones exprimant la GFP parmi la population neuronale totale visualisée grâce à des immunomarquages de NeuN (Neuronal Nuclei Antigen). D'autres immunomarquages nous ont permis de mesurer dans le hilus et la couche granulaire du gyrus denté les densités de marqueurs classiques d'interneurones : Calretinine (CR), Parvalbumine (PV), Somatostatine (SOM), Neuropeptide Y (NPY), Oxyde Nitrique Synthétase 1 (NOS1) et Peptide Vasoactif Intestinal (VIP). En outre, pour compléter cette caractérisation des interneurones, leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques ont été étudiées individuellement. L'approche utilisée est la RT-PCR en multiplex sur cellule unique après enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp et injection de biocytine chez des souris C57Bl6 âgées de 2 à 3 mois. Les marqueurs analysés par RT-PCR sont identiques à ceux étudiés en immunomarquages. Une analyse non supervisée en clusters, prenant en compte les paramètres électrophysiologiques et moléculaires, a fait ressortir la prééminence de deux grands types cellulaires : les neurones glutamatergiques vs les interneurones GABAergiques, eux-même divisés par la suite en trois clusters. En améliorant notre connaissance de la diversité des interneurones du hilus

du gyrus denté chez la souris adulte, cette étude servira de base pour de futurs travaux s'intéressant à leur rôle physiologique, par exemple dans la maturation et la survie des neurones nouvellement générés, ou à leur implication dans des neuropathologies.

En parallèle nous avons mené, en collaboration avec Claire Rampon (Centre de Recherches sur la Cognition Animale), un projet visant à stimuler la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe de souris. Pour cela des souris ont reçu une injection intra-hippocampique d'un rétrovirus dirigeant l'expression de eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) et du facteur de transcription proneural NeuroD1. Les résultats obtenus au CRCA sur ce projet montrent que la transduction de ce rétrovirus dans les nouvelles cellules de l'hippocampe conduit à leur maturation en neurone, et accélère leur développement morphologique. Il était primordial de vérifier que les neurones transduits marqués par la GFP, et sur-exprimant NeuroD1, possèdent des caractéristiques électrophysiologiques de neurones fonctionnels. Nous avons montré que ces neurones NeuroD1-GFP+ sont capables d'émettre des potentiels d'action, et ce plus précocément que des neurones ne sur-exprimant pas NeuroD1, et de recevoir des afférences GABAergiques et glutamatergiques. Les neurones NeuroD1-GFP+ sont donc fonctionnels et bien intégrés au réseau hippocampique. Ces avancées pourraient permettre d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans les pathologies affectant la neurogénèse hippocampique.

TABLE DES MATIERES

Abréviations.....	7
I INTRODUCTION.....	8
1. Description anatomique de la formation hippocampique.....	8
a. Complexe subiculaire et cortex entorhinal.....	11
b. L'hippocampe propre.....	11
c. Le gyrus denté.....	12
d. La boucle trisynaptique.....	15
e. Rôle de l'hippocampe.....	18
i. Mémoire.....	18
ii. Navigation spatiale.....	20
f. Hippocampe dorsal versus hippocampe ventral ?.....	22
2. Neurones du gyrus denté chez le rongeur.....	24
a. Classification morphologique des neurones du gyrus denté.....	26
i. Cellules moussues.....	26
ii. Cellules en panier ou « basket cells ».....	27
iii. Cellules axoaxoniques ou cellules chandelier.....	28
iv. Cellules HIPP (Hilar Perforant Path-associated).....	29
v. Cellules HICAP (Hilar Commissural-Associational Pathway related).....	30
vi. Cellules MOPP (Molecular layer Perforant Path-associated).....	31
vii. Autres neurones.....	33
b. Caractéristiques moléculaires des neurones du gyrus denté.....	34
i. Calrétinine (CR).....	34
ii. Calbindine (CB).....	34
iii. Parvalbumine (PV).....	35
iv. Neuropeptide Y (NPY).....	35
v. Somatostatine (SOM).....	36
vi. Cholecystokinine (CCK).....	37
vii. Peptide Vasoactif Intestinal (VIP).....	37
viii. Oxyde Nitrique Synthétase neuronale (NOS1).....	38
c. Classification électrophysiologique des neurones du gyrus denté.....	38
i. Les cellules granulaires.....	40
ii. Les cellules moussues.....	41
iii. Les interneurons du hilus.....	42
d. Connectivités au sein du gyrus denté.....	45
3. Neurogénèse hippocampique adulte.....	47
a. Méthodologies.....	47
b. Différentes phases.....	49
i. Cellules souches.....	49
ii. Cellules progénitrices.....	49
iii. Cellules granulaires immatures.....	51
iv. Cellules granulaires matures.....	52
4. Maladies neurodégénératives affectant l'hippocampe.....	53

a. Epilepsie.....	53
i. Présentation générale de l'épilepsie.....	53
ii. Epilepsie et gyrus denté.....	54
b. Maladie d'Alzheimer.....	56
i. Présentation générale de la maladie d'Alzheimer.....	56
ii. Maladie d'Alzheimer et gyrus denté.....	59
5. Introduction des résultats.....	60
II RESULTATS.....	63
1. Article 1.....	63
a. Présentation de l'article 1.....	63
b. Article 1 : Multiparametric characterization of GABAergic and glutamatergic neurons of the hilar dentate gyrus in mice.....	66
c. Conclusions et perspectives de l'article 1.....	109
2. Article 2.....	113
a. Présentation de l'article 2.....	113
b. Article 2 : Manipulating hippocampal progenitors to stimulate the production of news neurons in the adult mouse brain.....	117
i. Introduction.....	117
ii. Matériels et Méthodes.....	118
iii. Résultats.....	121
c. Conclusions et perspectives de l'article 2.....	126
III DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	128
IV REFERENCES.....	136

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : L'hippocampe.....	8
Figure 2 : La formation hippocampique dans un cerveau de rat.....	9
Figure 3 : Section coronale d'un cerveau de souris colorée par la méthode de Nissl.....	9
Figure 4 : Coupe transversale de la formation hippocampique.....	10
Figure 5 : Le gyrus denté.....	13
Figure 6 : Gyrus denté et hippocampe chez la souris.....	14
Figure 7 : Boucle trisynaptique.....	15
Figure 8 : Schéma des connectivités de la formation hippocampique.	17
Figure 9 : Taxonomie des systèmes de mémoire chez le mammifère.....	19
Figure 10 : Les cellules de direction de la tête montrent une intégration de trajet angulaire.....	21
Figure 11 : Les principaux axes de référence de l'hippocampe.....	23
Figure 12 : dessin du circuit neuronal de l'hippocampe chez le rongeur.....	24
Figure 13 : Immunomarquage des neurones d'une section de gyrus denté.....	25
Figure 14 : Morphologie d'une cellule moussue.....	27
Figure 15 : Reconstruction d'une cellule en panier chez la souris à P21.....	28
Figure 15 : Reconstruction d'une cellule HIPP.....	29
Figure 17 : Reconstruction d'une cellule HICAP.....	30
Figure 18 : Reconstruction d'une cellule MOPP.....	31
Figure 19 : Neurones du hilus du gyrus denté.....	32
Figure 20 : Classification morphologique des interneurones du gyrus denté.....	33
Figure 21 : Physiologie d'une cellule granulaire.....	40
Figure 22 : Physiologie d'une cellule moussue.....	41
Figure 23 : Physiologie d'une cellule en panier.....	42
Figure 24 : Physiologie d'un interneurone du hilus avec épines.....	43
Figure 25 : Physiologie d'un interneurone du hilus dépourvu d'épines.....	44

Figure 26 : Schéma des connectivités au sein du gyrus denté.....	46
Figure 27 : Méthodologies pour l'analyse de la neurogénèse adulte in vivo.....	48
Figure 28 : Neurogénèse adulte dans le gyrus denté de l'hippocampe.....	50
Figure 29 : 3 hypothèses concernant le rôle des cellules mossues dans l'épilepsie.....	55
Figure 30 : Plaques amyloïdes et corps neurofibrillaires.....	57
Figure 31 : Le peptide amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer.....	58
Figure 32 : Etapes de l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par J. Hardy et D. Allsop (1991).....	58

ABREVIATIONS

CA : Corne d'Ammon

PV : Parvalbumine

NOS1 : Oxyde Nitrique Synthétase 1

CA : Calrétinine

CB : Calbindine

VIP : Peptide Vasoactif Intestinal

NPY : Neuropeptide Y

SOM : Somatostatine

GABA : Acide γ -aminobutyrique

VGLUT1 : Transporteur vésiculaire du glutamate 1

GAD : Glutamate Acide Décarboxylase

HIPP cell : Hilar perforant path-associated cell

HICAP cell : Hilar commissural-associational pathway-related cell

MOPP : Molecular layer perforant path-associated cell

BrdU : Bromodéoxyuridine

NeuN : Antigène nucléaire neuronal

A β : Bêta-amyloïde

APP : Protéine précurseur de l'A β

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NKCC1 : co-transporteur 1 Na⁺-K⁺-Cl⁻

KCC2 : co-transporteur 2 K⁺-Cl⁻

ARNm : Acide ribonucléique messenger

GFP : Green Fluorescent Protein

I INTRODUCTION

1. Description anatomique de la formation hippocampique

La dénomination d'hippocampe est apparue dès le XVI^{ème} siècle, suite aux observations d'un anatomiste vénitien, Julius Caesar Aranzi (1587) qui fit le rapprochement entre la forme de cette structure du cerveau et celle d'un hippocampe (figure 1). Cette appellation fut par la suite réemployée par de nombreux anatomistes et officiellement acceptée dans le Nomina Anatomica, ancienne classification internationale de l'anatomie humaine.

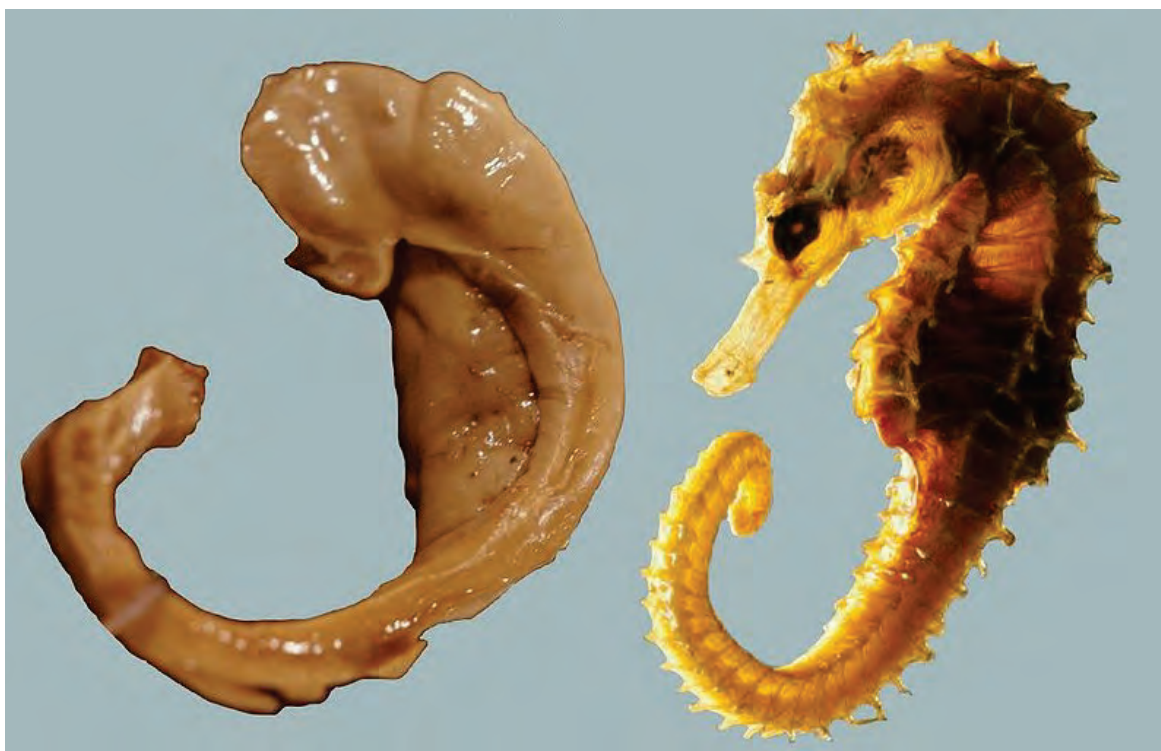


Figure 1 : L'hippocampe. A gauche, préparation d'un hippocampe et d'un fornix humain par le neuroscientifique hongrois László Seress en 1980, à droite, un hippocampe (animal).

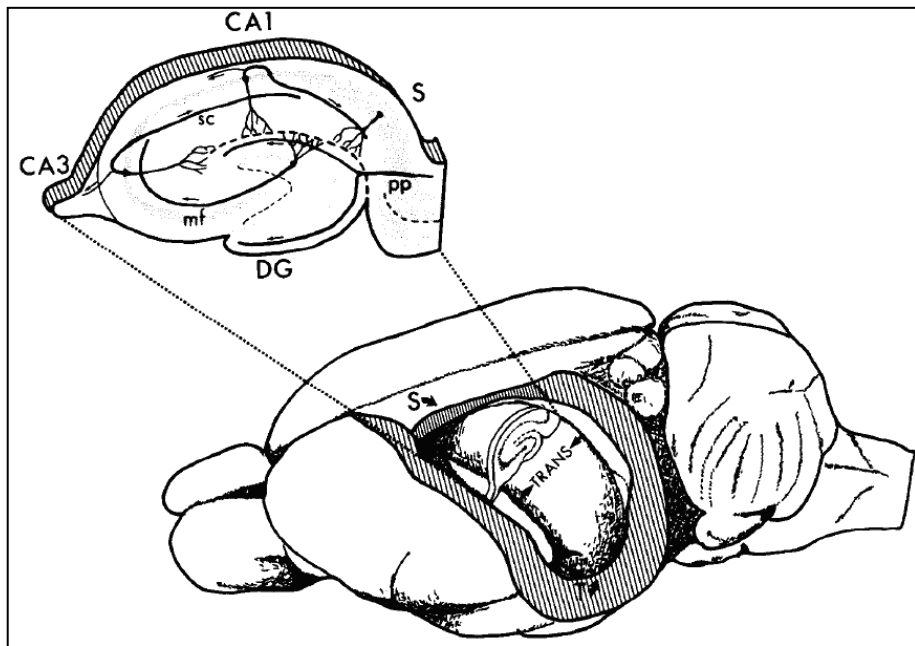


Figure 2 : La formation hippocampique dans un cerveau de rat. DG: dentate gyrus (gyrus denté), CA1: corne d'Ammon 1, CA3: corne d'Ammon 3, S: subiculum, pp: perforant pathway (voie perforante), mf: mossy fibers (fibres moussues), sc: Schaffer's collaterals (collatérales de Schaffer).
D'après Amaral and Witter, 1989.

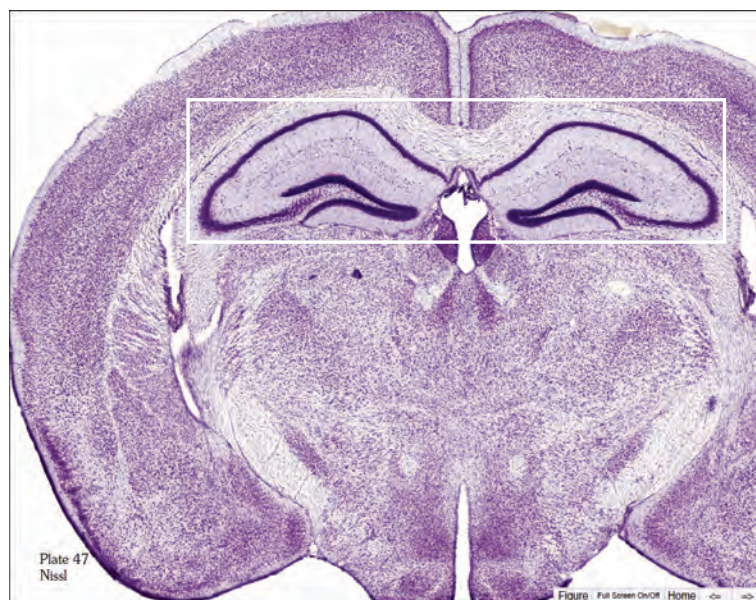


Figure 3 : Section coronale d'un cerveau de souris colorée par la méthode de Nissl. L'encadré blanc indique la position de l'hippocampe dans les deux hémisphères.
D'après le Mouse Brain Atlas.

La formation hippocampique est une structure située dans le lobe temporal médian du cerveau, sous la surface corticale. Chez les mammifères, elle est présente de manière symétrique dans les deux hémisphères cérébraux. Il n'existe pas de consensus quant à sa composition : certains la limitent à l'hippocampe, au gyrus denté et au subiculum quand d'autres incluent également le presubiculum, le parasubiculum et le cortex entorhinal (figures 2, 3 et 4). Quoiqu'il en soit tous s'accordent pour lui attribuer un rôle prépondérant dans les processus mnésiques ainsi que la navigation spatiale.

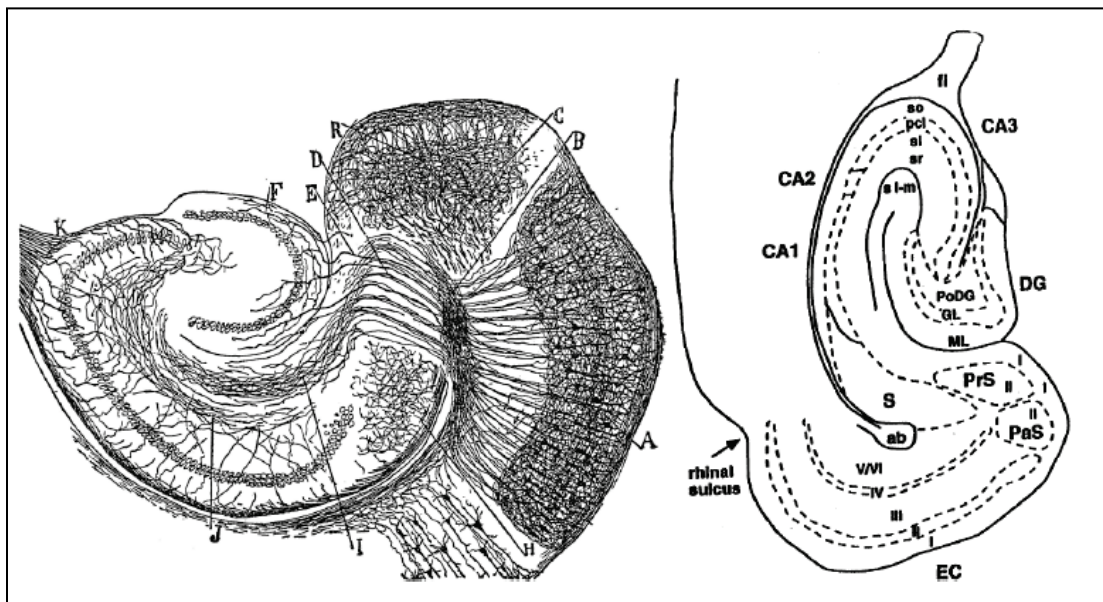


Figure 4 : coupe transversale de la formation hippocampique. A gauche, marquage par la méthode de Golgi sur souris (Cajal, 1911). B, C,H: fibres comprenant le faisceau angulaire (perforant) et les fibres cingulaires /calleuses traversant le plan de coupe. D,E,F,I: fibres perforantes. A droite, nomenclature actuelle des régions, d'après une tranche de rat (O'Mara et al., 2001). DG : dentate gyrus (gyrus denté), CA1 : corne d'Ammon 1, CA2 : corne d'Ammon 2, CA3 : corne d'Ammon 3, ML : molecular layer (couche moléculaire), GL : granular layer (couche granulaire), Po : polymorphic layer (couche polymorphique), so : stratum oriens, pcl : pyramidal cell layer (couche cellulaire pyramidale), sl : stratum lacunosum, sr : stratum radiatum, slm : stratum lacunosum moleculare, S : subiculum, PrS : presubiculum, PaS : parasubiculum, EC : entorhinal cortex (cortex entorhinal).

a. Complexe subiculaire et cortex entorhinal

Le complexe subiculaire est composé du subiculum, présubiculum et parasubiculum (figure 4). Il est une zone de transition entre les six couches du néocortex et l'archicortex.

Le subiculum est le prolongement du CA1. Il est constitué de trois couches : une couche moléculaire (ou superficielle) située dans le prolongement du lacunosum moleculare du CA1, une couche de cellules pyramidales dans le prolongement du stratum pyramidale de CA1, et enfin une couche polymorphique (ou profonde) dans le prolongement du stratum oriens de CA1. Les régions du présubiculum et parasubiculum ressemblent plus au néocortex, avec une organisation typique à 6 couches (Amaral and Witter, 1989, O'Mara *et al.*, 2001, Scharfman *et al.*, 2000, Witter *et al.*, 2000).

Le cortex entorhinal contient des types cellulaires morphologiques distincts, et se subdivise en six couches comme le néocortex bien que la couche IV y soit moins développée.

b. L'hippocampe proprement dit (corne d'Ammon)

Le terme « cornu Ammonis » a été proposé en 1742 par le chirurgien français De Garengeot en référence au dieu de l'Égypte ancienne Amon. Chez les mammifères la forme tridimensionnelle de l'hippocampe est relativement complexe. Globalement l'hippocampe a une forme de tube recourbé, dont l'axe principal s'étend du noyau septal rostro-dorsal au lobe temporal caudo-ventral. Cet axe est généralement appelé l'axe septo-temporal, alors que l'axe orthogonal est qualifié de transverse. Chez les rongeurs les hippocampes des deux hémisphères cérébraux sont reliés à leur extrémité par la commissure hippocampique, située au milieu du cerveau juste sous la partie antérieure du corps calleux qui relie les deux hémisphères.

L'hippocampe propre peut être divisé en trois parties : CA1, CA2 et CA3 en fonction de la taille et de la densité des cellules pyramidales qui les composent (figure 4). L'organisation en couches est visible sur les tranches, on distingue la *stratum pyramidale* comprenant les somas des cellules principales, les cellules pyramidales. De part et d'autre de la corne d'Ammon se trouvent les couches polymorphique du côté basal et moléculaire du côté apical. Les cellules pyramidales constituent environ 90% des neurones de l'hippocampe propre (Traub, 1991). Le nom de ces cellules provient de la forme spécifique de leur soma qui possède une unique grosse dendrite initiale apicale, et plusieurs dendrites initiales basales plus petites. Ces dendrites sont couvertes d'épines dendritiques sur lesquelles terminent la plupart des connexions excitatrices. Dans CA3, les épines proximales, appelées « excroissances épineuses », sont particulièrement développées et reçoivent chacune des terminaisons synaptiques complexes venant d'une fibre moussue. Les axones des cellules pyramidales sont myélinisés sur leur portion qui projette hors de l'hippocampe, tandis que la partie formant les connexions récurrentes et les collatéraux de Schaffer ne le sont pas. Les cellules pyramidales de la région CA3 ont des corps cellulaires plus gros que celles de CA1. La région CA2 a des frontières peu précises, elle correspondrait à une petite région de cellules pyramidales spécifiques, similaires à celles de la région CA3 mais ne recevant pas d'innervation des fibres moussues (Lorente de Nó, 1934).

c. Le gyrus denté

Le gyrus denté est composé de trois couches : la couche moléculaire, la couche granulaire et la couche polymorphique également appelée hilus (figures 5 et 6).

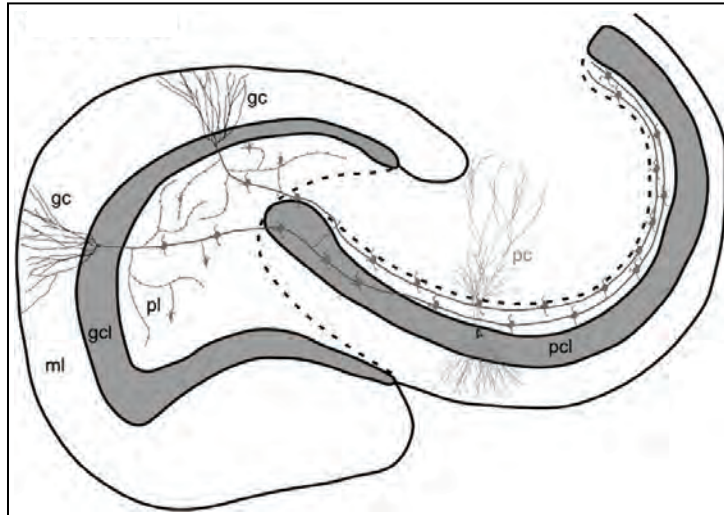


Figure 5 : Le gyrus denté. Pcl : pyramidal cell layer, pc : pyramidal cell, ml : molecular layer, gcl : granule cell layer, pl : polymorphic layer, gc : granule cell.

La couche moléculaire est la moins densément peuplée de neurones. Elle est pour l'essentiel occupée par les dendrites des cellules granulaires ainsi que les fibres de la voie perforante en provenance du cortex entorhinal. Quelques interneurons sont néanmoins présents et ont une action inhibitrice sur les cellules granulaires en projetant vers leurs dendrites. Ces neurones sont appelés MOPP pour « molecular layer perforant path-associated cells » (Halasy and Somogyi, 1993). En effet leur principale source d'excitation provient du cortex entorhinal par la voie perforante, mais celle-ci peut également provenir de fibres d'association, provenant de neurones du hilus du même hémisphère, ou de fibres commissurales, provenant de neurones du hilus de l'hémisphère opposé.

La couche granulaire se divise en lames supra-pyramidale et infra-pyramidale qui se rejoignent pour former la crête. Dans la plupart des coupes coronales, sagittales et horizontales, elle apparaît en forme de V ou de U. Elle est la couche la plus dense du gyrus denté, les cellules principales excitatrices qui la peuplent, appelées cellules granulaires y sont agrégées les unes aux autres sur une épaisseur de quelques dizaines de micromètres chez les rongeurs. Par ailleurs,

quelques interneurons inhibiteurs, largement minoritaires, se retrouvent disséminés dans la couche granulaire. Les cellules en grain sont relativement petites. Leurs dendrites apicales s'étendent uniquement dans la couche moléculaire, située du côté du CA1 et du subiculum.

Enfin, la couche granulaire encercle une dernière région cellulaire : la couche polymorphique ou hilus. Une grande variété de types cellulaires existe dans cette couche, avec toutefois une prépondérance des cellules mossues excitatrices.

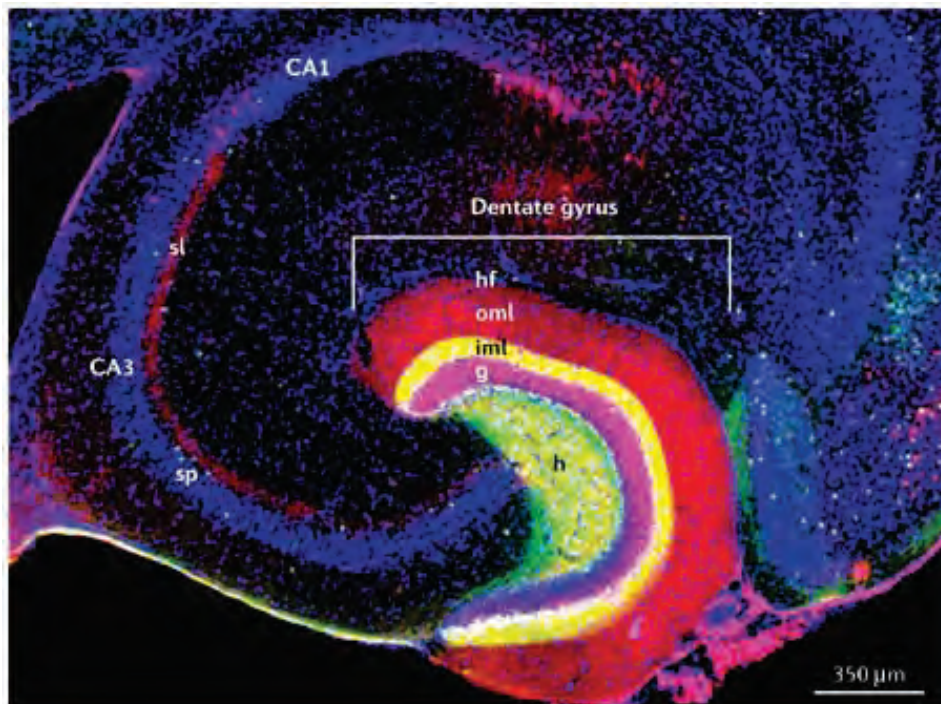


Figure 6 : Gyrus denté et hippocampe chez la souris. En combinant différentes méthodes de marquage, les arrangements des neurones et des fibres de projection des couches de l'hippocampe peuvent être visualisés. Les cellules mossues du hilus (h) sont marquées en vert pour la calrétinine. Les axones de ces neurones projettent dans la couche moléculaire intérieure (iml) de manière ipsilatérale et contralérale (fibres commissurales et d'association). La couche moléculaire extérieure (oml) est la zone de terminaison des fibres du cortex entorhinal. Les corps cellulaires sont contre-colorés avec le DAPI (bleu), marquant ainsi la couche pyramidale (sp) de CA1 et CA3, et la couche granulaire (g) du gyrus denté. Les cellules granulaires sont aussi marquées pour la calbindine (rouge), qui permet de visualiser leurs dendrites s'étendant vers la fissure de l'hippocampe (hf) et leurs axones, les fibres mossues, terminant dans le stratum lucidum (sl) de CA3.

D'après Förster et al., 2006.

d. La boucle trisynaptique

Les différentes régions cellulaires de l'hippocampe sont étroitement interconnectées. Un certain nombre d'études physiologiques et anatomiques (Ramon y Cajal, 1893 ; Lorente de No, 1933 ; Lorente de No, 1934 ; Raisman et al., 1965 ; Blackstad, 1956 ; Blackstad, 1958 ; Blackstad et al., 1970) ont conduit Andersen à émettre, à la fin des années 1960, l'hypothèse que ces connections se font de manière lamellaire (Andersen et al., 1969). « The lamellar hypothesis » propose que les quatre voies successivement activées lors d'une stimulation du cortex entorhinal (voie perforante, fibres moussues, collatérales de Schaffer, fibres du CA1) sont toutes orientées dans la même direction, transversalement à l'axe principal de l'hippocampe. L'hippocampe serait ainsi une succession de bandes parallèles qui pourraient opérer comme des unités fonctionnelles indépendantes.

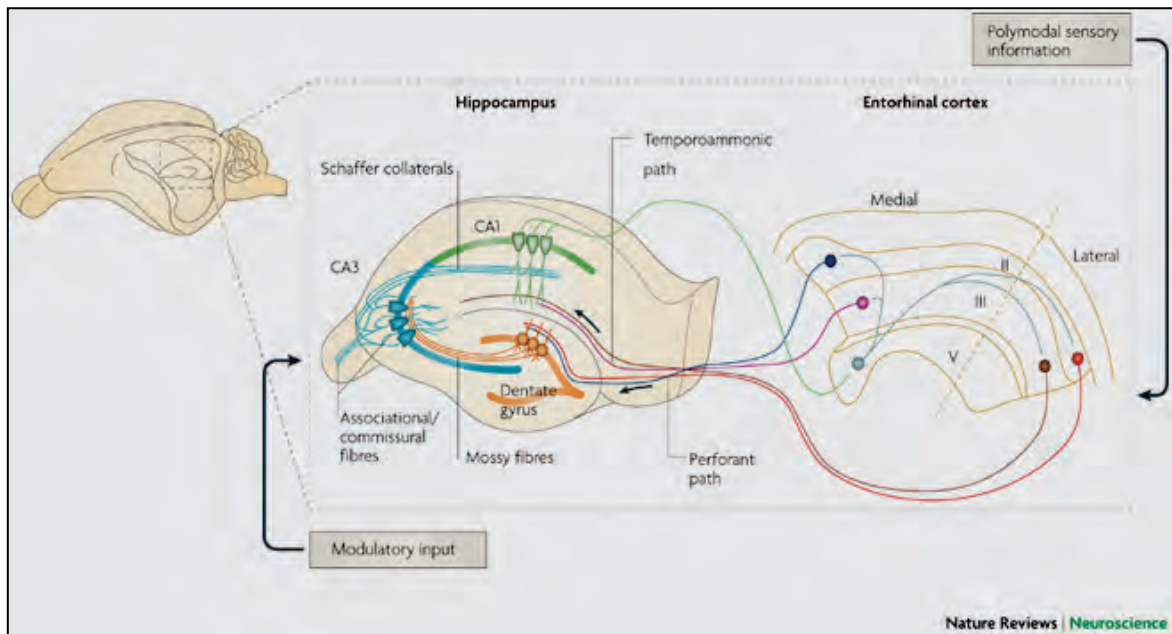


Figure 7 : Boucle trisynaptique. La voie perforante (perforant path) du cortex entorhinal projette sur le gyrus denté, qui projette sur le CA3 via les fibres moussues (mossy fibers). Le CA3 projette sur le CA1 via des fibres commissurales et d'association, les collatérales de Schaffer. Enfin, le CA1 projette à son tour vers le cortex entorhinal. D'après Neves et al., 2008.

Cette boucle d'activation (cortex entorhinal, gyrus denté, CA3, CA1, cortex entorhinal) est qualifiée de circuit trisynaptique (figure 7). Elle est unidirectionnelle et principalement glutamatergique (Amaral and Witter, 1995). Le cortex entorhinal projette sur le gyrus denté via la voie perforante. Les cellules granulaires du gyrus denté projettent ensuite massivement via leurs axones sur l'arborisation dendritique des cellules pyramidales de CA3, formant ainsi les fibres moussues. Ces cellules pyramidales envoient à leur tour leurs prolongements axoniques (collatérales de Schaffer) sur les cellules pyramidales de CA1 selon une topographie extrêmement précise.

Longtemps décrite comme l'unique organisation interne de l'hippocampe, cette organisation lamellaire n'est cependant pas la seule. En effet, les cellules de CA3 envoient de nombreuses projections sur les autres cellules pyramidales de CA3 par des collatérales axoniques. L'existence de ce circuit récurrent (système collatéral récurrent) fait de CA3 une région très fortement interconnectée de l'hippocampe. Cette structure est de ce fait, importante dans l'acquisition rapide d'information (Rolls and Kesner, 2006), ce qui contraste beaucoup avec l'organisation de CA1 où les cellules pyramidales ne sont que faiblement interconnectées. De plus, il existe des projections directes du cortex entorhinal sur CA1, CA2 et CA3 (Witter and Moser, 2006 ; Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). CA1 projette d'ailleurs en retour sur le cortex entorhinal via le subiculum. Par ailleurs, au sein de chacun des champs hippocampiques, il existe de nombreux interneurons majoritairement GABAergiques (Freund and Buzsaki, 1996; Jinno and Kosaka, 2006) qui possèdent des arborisations axonales étendues et dirigées aussi bien transversalement que longitudinalement. L'organisation hippocampique conduit donc à de nombreuses interactions entre neurones appartenant à des domaines hippocampiques distincts.

Les hippocampes droit et gauche échangent également des informations entre eux, via les fibres commissurales: les cellules pyramidales de CA1 et CA3 se projettent en effet aussi sur l'hippocampe controlatéral. A cette organisation architecturale interne complexe, il faut ajouter

les relations diverses que l'hippocampe entretient avec les autres structures environnantes (figure 8).

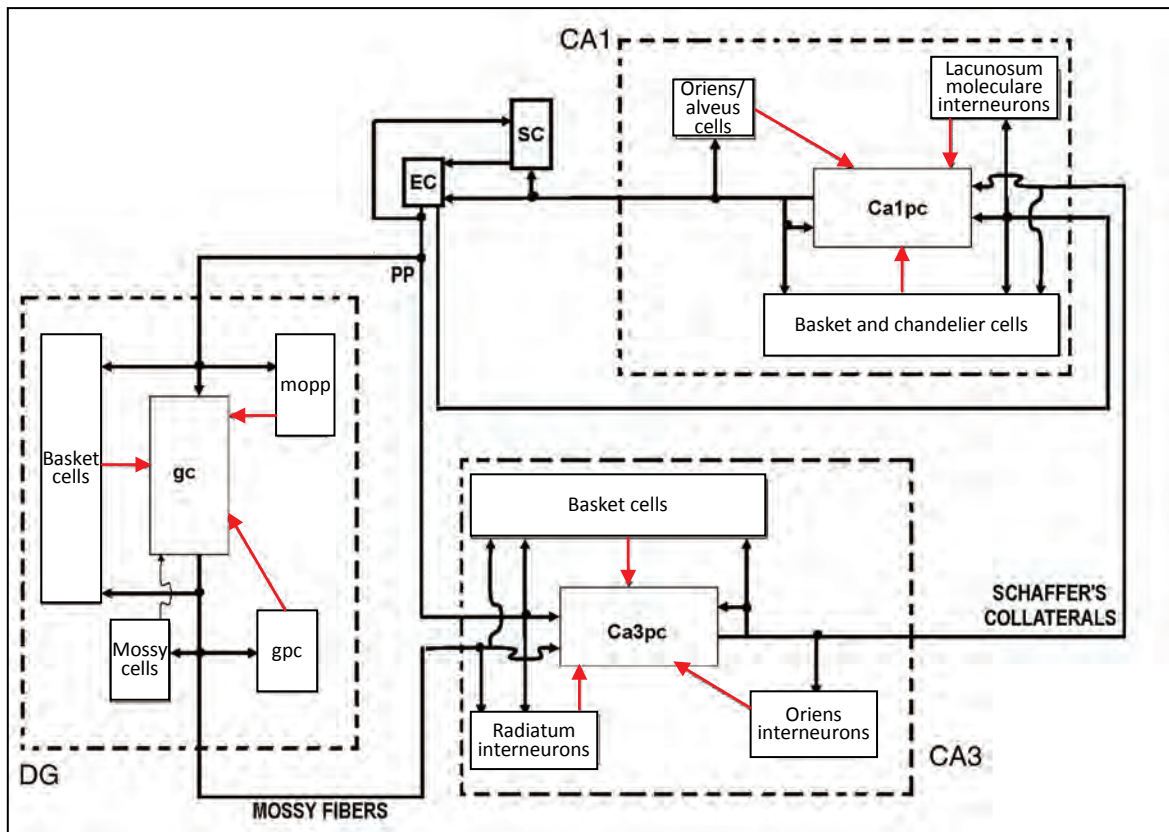


Figure 8 : Schéma des connectivités de la formation hippocampique. Chaque encadré correspond à une classe cellulaire, à l'exception de EC (cortex entorhinal) et SC (subiculum) qui représentent des sous-régions entières du réseau. Les connexions excitatrices sont représentées par des flèches noires et les connexions inhibitrices par des flèches rouges. EC : cortex entorhinal (entorhinal cortex), SC : complexe subiculaire (subicular complex), PP : voie perforante (perforant pathway), DG : gyrus denté (dentate gyrus), gc : cellules granulaires (granule cells), mopp : cellules de la couche moléculaire reliées à la voie perforante (molecular perforant pathway-related cells), gpc : cellules GABAergiques du hilus (GABAergic polymorphic cells), Ca1pc : cellules pyramidales du CA1 (CA1 pyramidal cells), Ca3pc : cellules pyramidales du CA3 (CA3 pyramidal cells).

D'après Ascoli and Atkeson, 2005.

e. Rôle de l'hippocampe

i. Mémoire

Chez les mammifères et chez l'Homme, l'hippocampe est considéré comme l'une des structures cérébrales indispensables à la mémorisation. L'étude clinique de patients amnésiques ayant subi des lésions des lobes temporaux cérébraux a permis de souligner son importance. Le célèbre cas du patient H.M., rapporté par William Scoville et Brenda Milner en 1957 (Scoville and Milner, 1957), a fourni des informations majeures quant aux aspects neurobiologiques de la mémoire. H.M. avait subi une ablation bilatérale des hippocampes dans le but de soigner une épilepsie sévère du lobe temporal. Cette opération, qui l'avait guéri de son épilepsie, avait provoqué un déficit de mémorisation très important : perte totale des souvenirs récents et incapacité à en stocker de nouveaux. H.M pouvait toutefois retenir une information pendant quelques minutes à l'aide de stratégies mnémotechniques et en maintenant activement et continuellement l'information en mémoire. Cependant au bout d'un certain laps de temps et dès que son attention était redirigée, il perdait l'information et ne se souvenait absolument pas de l'exercice qu'il venait de réaliser. Initialement, Milner pensait que le handicap mnésique de H.M était total, mais en 1962, elle démontra qu'il était capable de développer une sorte de mémoire inconsciente (Tulving, 1972). En effet, il parvenait à exécuter un certain nombre de tâches relevant de la mémoire à long terme, mais qui ne faisaient pas appel explicitement et consciemment aux informations acquises. Par exemple, il réussissait à apprendre et à progresser dans la tâche du dessin en miroir, qui consiste à reproduire par le dessin une image inversée par un miroir, et ce sans jamais se rappeler qu'il l'avait déjà dessiné les jours précédents. Grâce à ces travaux plusieurs principes fondamentaux ont été mis à jour : une lésion du lobe temporal médian affecte les processus cognitifs de mémorisation sans affecter les aptitudes perceptives et cognitives globales ; mémoire à court terme et mémoire à long terme sont dissociées (figure 9);

la mémoire à long terme revêt plusieurs formes, notamment la mémoire déclarative, qui peuvent faire appel à différentes structures cérébrales.

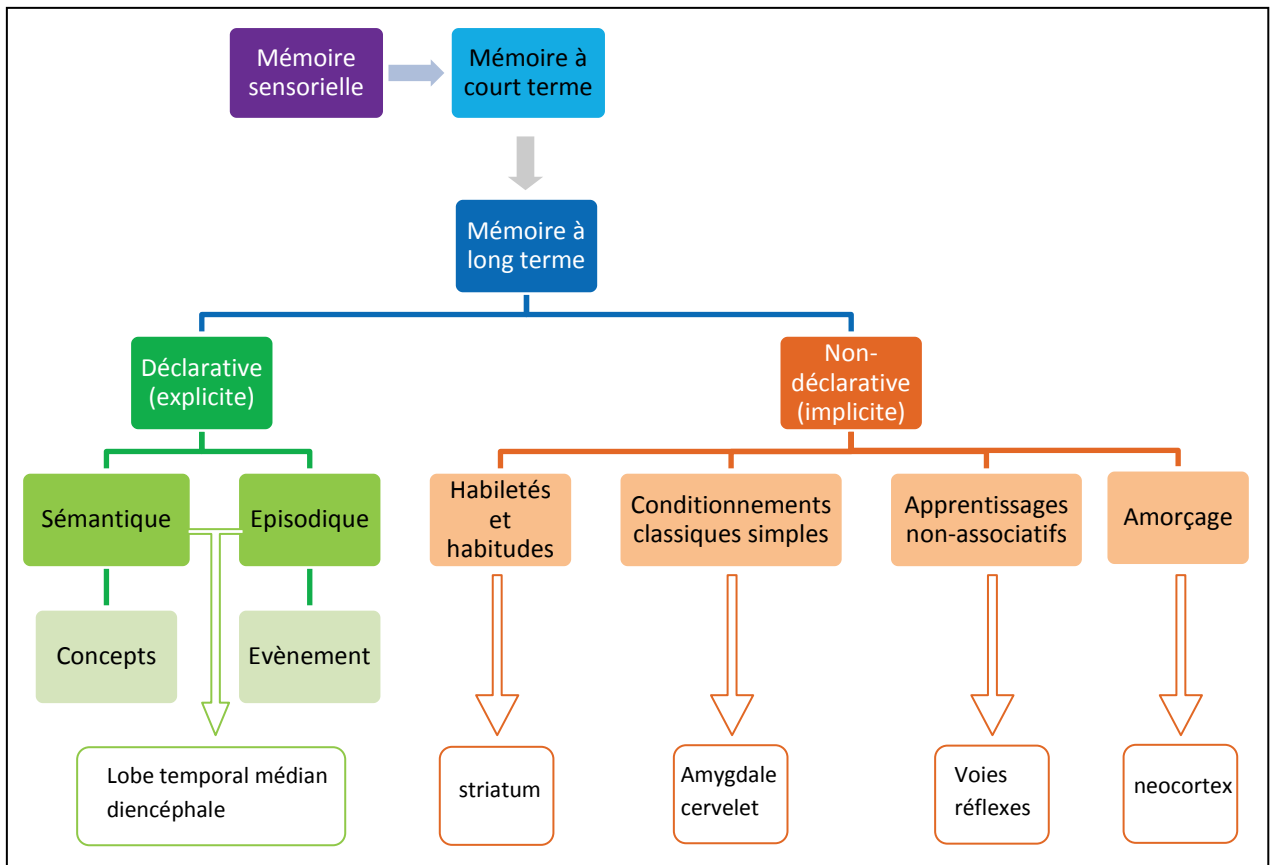


Figure 9 : Taxonomie des systèmes de mémoire chez le mammifère. La mémoire est généralement divisée en mémoire sensorielle, mémoire à court terme et mémoire à long terme. Cette dernière peut être déclarative ou non-déclarative et subdivisée en différents types de mémoires qui sollicitent différentes régions du cerveau.

Adapté d'après Squire, 2004

A l'heure actuelle des incertitudes demeurent sur le nombre exact de systèmes mnésiques, mais un certain consensus semble atteint sur les régions cérébrales qui les sous-tendent, et le rôle de l'hippocampe dans les mémoires déclarative et épisodique (Wood et al., 1999 ; Cohen and Squire, 1980 ; Vargha-Khadem et al., 1997). La classification proposée par Larry Squire (Squire, 2004) est l'une des plus utilisées (figure 9). Le critère majeur de distinction mis en avant est le

niveau de conscience avec lequel on fait appel à ses souvenirs : la capacité de se rappeler de faits ou d'évènements de manière explicite/consciente ou implicite/non consciente établit ainsi la différence entre mémoires déclarative et non déclarative.

ii. Navigation spatiale

Les cellules de lieu découvertes en 1971 par John O'Keefe et John Dostrovsky (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), constituent encore aujourd'hui l'argument majeur de l'implication de l'hippocampe dans le traitement de l'information spatiale. Ces cellules pyramidales des champs CA1 et CA3 ont la particularité de ne décharger que dans des régions restreintes de l'environnement de l'animal. Autrement dit, ces cellules dont l'activité est intrinsèquement liée à la position de l'animal, présentent un champ d'activité (« place field ») aux propriétés comparables par certains points aux champs récepteurs des cellules du cortex visuel décrites par Hubel and Wiesel (1959). Néanmoins, il est extrêmement difficile d'isoler le stimulus nécessaire et suffisant capable de déclencher une réponse des cellules de lieu. Les premières études visant à isoler ces caractéristiques montrent clairement la complexité et la diversité des réponses enregistrées (O'Keefe and Conway, 1978), ce qui reflète la diversité des entrées du système hippocampique, mettant en évidence l'intégration multimodale qui prédomine dans cette structure. S'il est encore difficile aujourd'hui d'expliquer de manière exhaustive "why [place cells] fire where they fire" (O'Keefe and Conway, 1978), plus de trente ans de recherche sur ce modèle cellulaire ont permis d'établir les caractéristiques essentielles de ces neurones pyramidaux (O'Keefe and Speakman, 1987 ; Muller and Kubie, 1987 ; O'Keefe and Burgess, 1996 ; Ranck, 1973 ; Jung et al., 1994).

Les cellules de direction de la tête constituent la seconde grande classe de cellules dont l'activité est spatialement modulée (figure 10). Ces cellules de direction ont été initialement découvertes

par James B. Ranck Jr. (Ranck, 1984) dans les couches profondes du présubiculum dorsal. Elles possèdent la particularité de ne décharger que suivant la direction dans laquelle la tête de l'animal se trouve dans le plan horizontal, quelle que soit sa position. La propriété fondamentale de ces cellules est donc d'être purement directionnelle, leur pic d'activité n'étant pas limité à un endroit particulier de l'environnement, mais se trouvant en tout point de l'espace, suggérant un mode de fonctionnement de type compas (Taube et al., 1990).

Ainsi, plus de quarante ans après la découverte des cellules de lieu par John O'Keefe et John Dostrovsky, l'implication de l'hippocampe dans les tâches de navigation spatiale est aujourd'hui acquise et mieux comprise (O'Keefe and Nadel, 1978 ; Wiener et al., 1989 ; Nadel, 1991; Jarrard, 1993; Best and White, 1999 ; Wood et al., 1999 ; Witter and Moser, 2006).

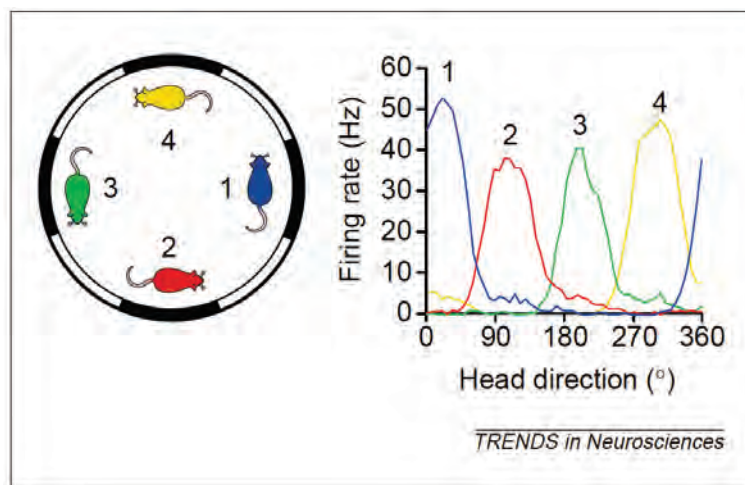


Figure 10 : Les cellules de direction de la tête montrent une intégration de trajet angulaire. Ce schéma représente le dispositif symétrique utilisé par Blair & Sharp (1996) pour tester la capacité d'intégration de trajet des cellules de direction. L'environnement visuel du dispositif est symétrique, et est constitué d'une alternance de patterns noirs et blancs de même largeur. L'environnement visuel est donc ambigu en ce qu'il ne possède pas d'indice visuel directionnel permettant d'orienter l'environnement. Le graphique représente les courbes de sélectivité directionnelle d'une seule et même cellule en fonction des différents points d'entrée de l'animal dans le dispositif.

D'après Sharp et al., 2001.

f. Hippocampe dorsal versus hippocampe ventral ?

Dès le début des années 1930 des études anatomiques suggèrent une différenciation de l'hippocampe selon son axe septotemporal (Lorente de No, 1934 ; Amaral and Witter, 1995). Par ailleurs des études électrophysiologiques (Elul, 1964 ; Brazier, 1970) et comportementales (Nadel, 1968 ; Stevens and Cowey, 1973 ; Koreli, 1977) sont venues étoffer cette hypothèse d'une non homogénéité anatomique de l'hippocampe. Plus récemment plusieurs équipes se sont intéressées aux potentielles distinctions fonctionnelles existant entre hippocampe dorsal/septal et hippocampe ventral/temporal (Moser and Moser, 1998 ; Hock and Bunsey, 1998 ; Bannerman, 1999 ; Richmond et al., 1999 ; Passino and Ammassari-Teule, 1999 ; Alescio-Lautier et al., 2000; Ferbinteanu and Mac-Donald, 2000, 2001 ; McHugh et al., 2011), par exemple en étudiant les effets de lésions effectuées soit dans la région septale, soit dans la région temporale (Moser et al., 1993, 1995). Ces études sembleraient étayer l'hypothèse d'une dissociation fonctionnelle de l'hippocampe selon son axe dorsoventral. Les données anatomiques confortant cette idée viennent principalement des circuits de connectivité extrinsèque de l'hippocampe. En effet les cortex perirhinal et postrhinal, considérés comme véhiculant les informations spatiales, projettent vers l'hippocampe via le cortex entorhinal avec des afférences plus nombreuses vers la région septale que temporale (Burwell et al., 1995; Burwell and Amaral, 1998a,b; Dolorfo and Amaral, 1998a,b). A l'inverse les projections de l'hypothalamus et de l'amygdale, supposées véhiculer des informations émotionnelles, se font exclusivement vers la région temporale (van Groen and Wyss, 1990; Jay et al., 1989; Köhler et al., 1985).

Cependant cette hypothèse d'une dissociation fonctionnelle des hippocampes ventral et dorsal, aussi séduisante soit elle, est aujourd'hui critiquée par certains comme une simplification excessive du fonctionnement réel de l'hippocampe, et de nombreuses études suggèrent que l'hippocampe ventral aurait également, sous certaines conditions, son mot à dire dans l'apprentissage et le rappel de tâches spatiales chez les rongeurs (Ogren et al., 1996; Schött et al.,

1998 ; Floresco et al., 1997 ; Levin et al., 1999 ; Vann et al., 2000 ; De Hoz et al., 2003 ; Loureiro et al., 2012) et les primates (Colombo and Gross, 1994; Colombo et al., 1998). Par ailleurs, l'implication du cortex perirhinal dans la mémoire spatiale fait débat (Wiig and Bilkey, 1994a,b; Nagahara et al., 1995; Liu and Bilkey, 1998a,b,c; Suzuki, 1996; Kolb et al., 1994; Wan et al., 1999; Bussey et al., 1999, 2000) et l'amygdale (Packard et al., 1994; Packard and Teather, 1998) et l'hypothalamus (Ohl and Fuchs, 1999; Hagan et al., 1998; Oomura et al., 1993) modèleraient le traitement de l'information spatiale dans l'hippocampe.

Ainsi les implications fonctionnelles des différences anatomiques observées entre les hippocampes dorsal et ventral semblent loin d'être évidentes. Cette difficulté pourrait provenir des circuits associatifs prolifères intrinsèques de l'hippocampe. La voie associative du CA3 et les collatérales de Schaffer s'étendent dans un large périmètre et permettraient de faire circuler les informations le long de l'axe longitudinal de l'hippocampe. Finalement, même si des différences le long de l'axe septotemporal suggèrent que les types d'informations et la manière dont elles sont traitées varient le long de cet axe, le système associatif interne de l'hippocampe permettrait de véhiculer ces informations et de les intégrer à une échelle plus globale.

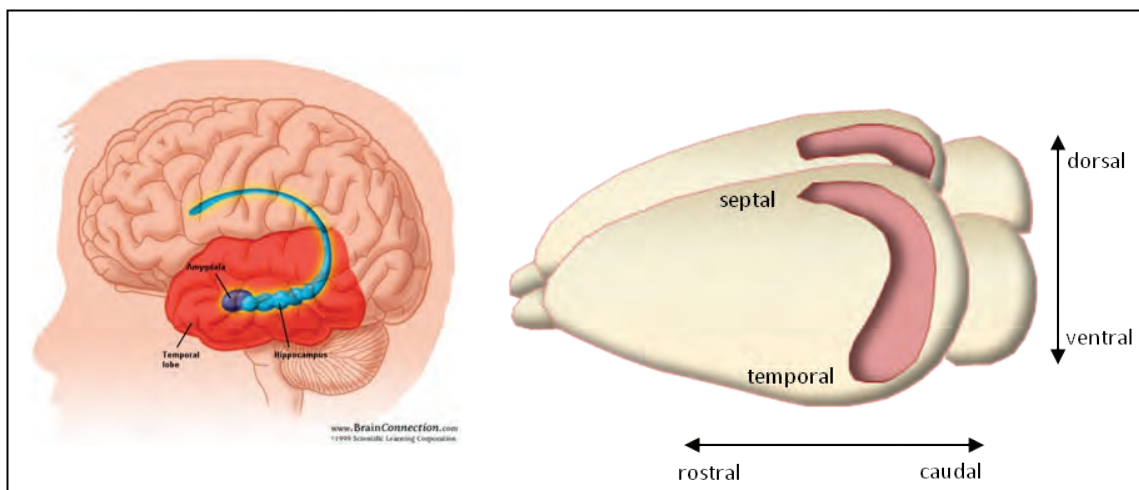


Figure 11 : Les principaux axes de référence de l'hippocampe. A gauche, un hippocampe (en bleu) de cerveau humain, et à droite un hippocampe (en rose foncé) de cerveau de souris. Les axes septo-temporal, dorso-ventral et rostro-caudal sont indiqués.

2. Neurones du gyrus denté chez le rongeur

L'étude des neurones néocorticaux a débuté au XIXème siècle avec les premières techniques de marquages histochimiques. Dès lors, l'extraordinaire diversité des cellules nerveuses qui peuplent cette structure a donné lieu à des études systématiques, visant à classifier ces neurones sur la base de leurs propriétés morphologiques. Ainsi Santiago Ramón y Cajal (1911) a dressé un véritable catalogue des neurones corticaux grâce à la méthode de coloration argentique mise au point par Camillo de Golgi (1873).

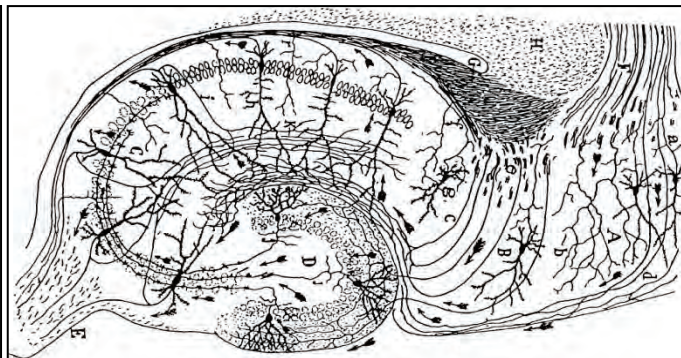


Figure 12 : A gauche, Santiago Ramón y Cajal dans son laboratoire. En haut, dessin du circuit neuronal de l'hippocampe chez le rongeur.

D'après Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris. 1911.

A la fin du XXème siècle, le développement des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation in situ a mené les anatomistes à classifier les neurones du cortex sur la base de l'expression de marqueurs biochimiques spécifiques (DeFelipe, 1993). Enfin, il est apparu, dès les premières études d'enregistrements intracellulaires in vivo, que les neurones néocorticaux ne possèdent pas tous les mêmes propriétés électrophysiologiques (Takahashi, 1965 ; Calvin and Sypert, 1976). La mise au point de la technique de patch-clamp sur des tranches de cerveau maintenues en survie (Edwards et al., 1989; Stuart et al., 1993), à partir des travaux d'Erwin Neher et Bert

Sakmann (1976, prix Nobel en 1991), a permis l'étude systématique des comportements de décharge de potentiels d'action de ces neurones, et a donné lieu à de nouvelles classifications.

La grande diversité des interneurones GABAergiques inhibiteurs (figure 13) de l'hippocampe a fait l'objet de nombreuses études systématiques de classification basées sur des critères anatomiques, biochimiques ou physiologiques, selon les méthodes d'investigation utilisées. Ces études ont pour objectif commun la définition de populations pertinentes d'interneurones, impliquées dans des fonctions spécifiques de la physiologie de l'hippocampe. Cependant, parce qu'elles ne tiennent compte que d'un nombre restreint de critères, les classifications ainsi établies sont difficilement comparables et tendent à multiplier le nombre de classes d'interneurones. En effet, la confrontation de ces diverses classifications révèle des recouvrements partiels, ce qui conduit à un nombre considérable de classes possibles.

Nous présenterons dans cette partie quelques propriétés caractéristiques des cellules principales du gyrus denté, les cellules granulaires et les cellules moussues, mais nous nous intéresserons plus particulièrement aux interneurones GABAergiques du hilus.

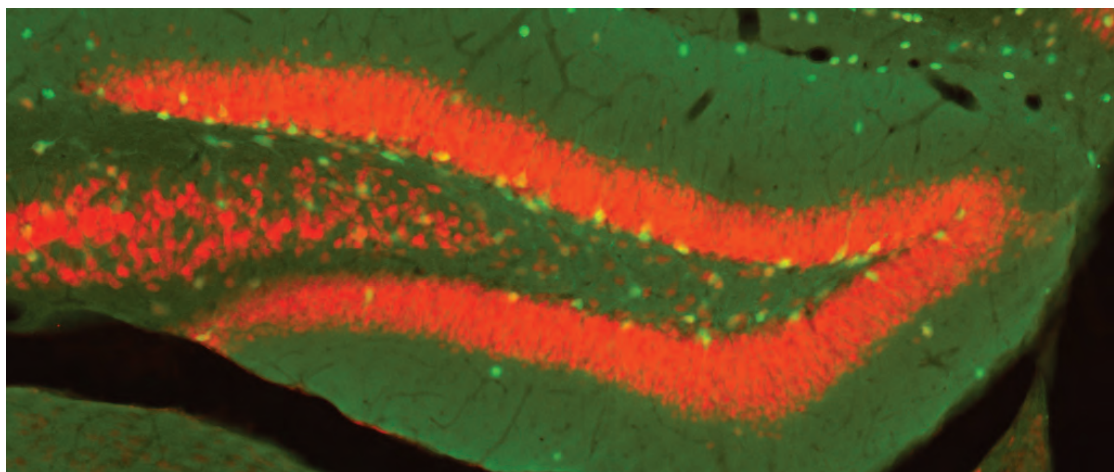


Figure 13 : Immunomarquage des neurones d'une section de gyrus denté. L'immunomarquage de NeuN (antigène nucléaire neuronal, en rouge) a été réalisé sur des tranches de cerveaux de souris transgéniques $GAD_{67}:GFP$ (P50) exprimant la GFP (en vert) sous le contrôle du promoteur de la GAD_{67} , une enzyme de synthèse du GABA).

a. Classification morphologique des neurones du GD

Les premières classifications des neurones du gyrus denté qui ont émergé font état d'au moins 21 types cellulaires dans le hilus seul (Amaral, 1978). Nous détaillerons ici une des classifications morphologiques des neurones du gyrus denté les plus utilisées actuellement, basée sur la localisation du soma et sur celle de l'arborisation axonale. Elle se compose de : cellules moussues, cellules en panier, cellules chandelier ou axo-axoniques, cellules HIPP (Hilar Perforant Path-associated), cellules HICAP (Hilar Commissural-Associational Pathway related) et cellules MOPP (MOlecular layer Perforant Path-associated cells).

i. Cellules moussues

Les cellules moussues ou « mossy cells » (Amaral, 1978), parfois considérées comme des cellules principales, constituent le type cellulaire le plus fréquent au sein du hilus. Environ la moitié des neurones du hilus sont des cellules moussues, l'autre moitié étant constituée d'interneurones GABAergiques (Buckmaster and Jongen-Rêlo, 1999). Elles correspondent à ce que Ramon y Cajal appelait les cellules « étoilées ou triangulaires » ou ce que Lorente de No nommait les « pyramides modifiées ». Les cellules moussues ont un corps cellulaire large (25-35 μm) et de forme triangulaire ou multipolaire (figures 14 et 19). Elles ont généralement 3 ou 4 dendrites qui se ramifient et restent confinées pour la plupart dans le hilus. Seules quelques rares dendrites atteignent la couche moléculaire. Les dendrites proximales sont couvertes d'épines larges et complexes, les « thorny excrescences » ou excroissances épineuses qui sont les sites de terminaison des fibres moussues. Les cellules moussues innervent à la fois les dendrites des cellules granulaires au niveau de la couche moléculaire et des interneurones GABAergiques du hilus, et leur arborisation axonale peut s'étendre sur une grande partie de l'axe principal du gyrus denté. (Freund and Buzsaki, 1996 ; Amaral et al., 2007 ; Scharfman, 1994 ; 1995 ; Amaral

and Witter, 1989 ; Soltesz and Mody, 1994 ; Ribak et al., 1985 ; Buckmaster et al., 1996 ; Laurberg and Sorensen, 1981 ; Frotscher and Zimmer, 1983a, 1983b ; Frotscher et al., 1984).

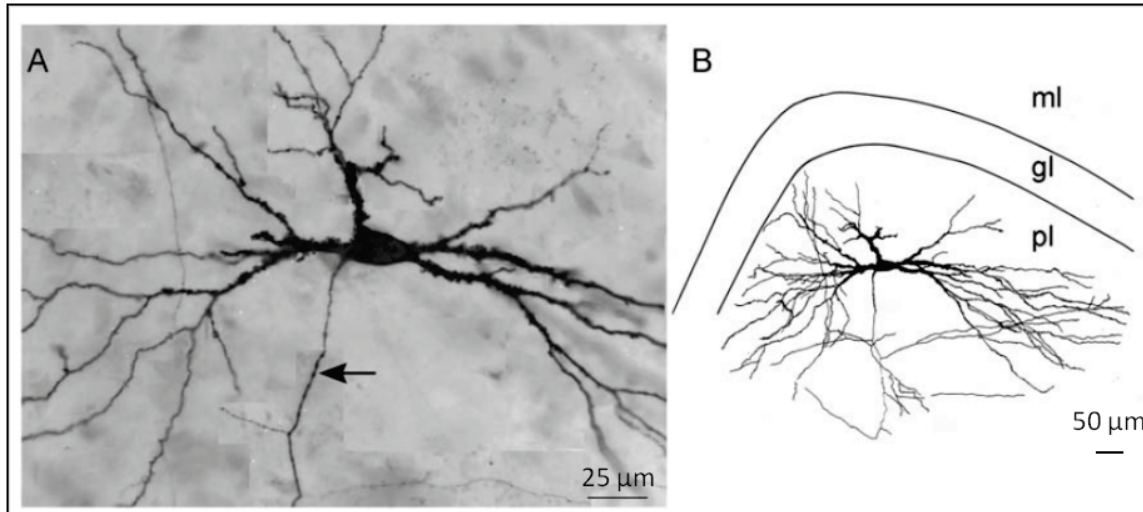


Figure 14 : Morphologie d'une cellule moussue. A. Photo d'une cellule moussue obtenue par superposition de différents plans focaux. La flèche pointe vers l'axone. B. Reconstruction de la même cellule moussue.
D'après Amaral, 2007.

ii. Cellules en panier ou « basket cells »

Le nombre de catégories de cellules en panier s'élève à 5 ou 6. Leur large corps cellulaire peut adopter une forme pyramidale, fusiforme ou multipolaire ; il est localisé juste à la limite entre le hilus et la couche granulaire ou un peu plus profondément dans la couche granulaire (figures 15, 19 et 20). Les dendrites des cellules en panier n'ont pas ou peu d'épines et s'étendent dans le hilus et la couche moléculaire. L'axone concentre une arborisation très dense au sein de la couche granulaire où les cellules en panier forment des contacts synaptiques avec le soma et les dendrites proximales des cellules granulaires, et éventuellement avec d'autres cellules en panier. (Lorente de No, 1934 ; Struble et al., 1978 ; Seress and Pokorny, 1981 ; Ribak and Seress, 1983 ; Seress and Ribak, 1983 ; 1990 ; Han et al., 1993 ; Freund and Buzsaki, 1996 ; Sik et al., 1997).

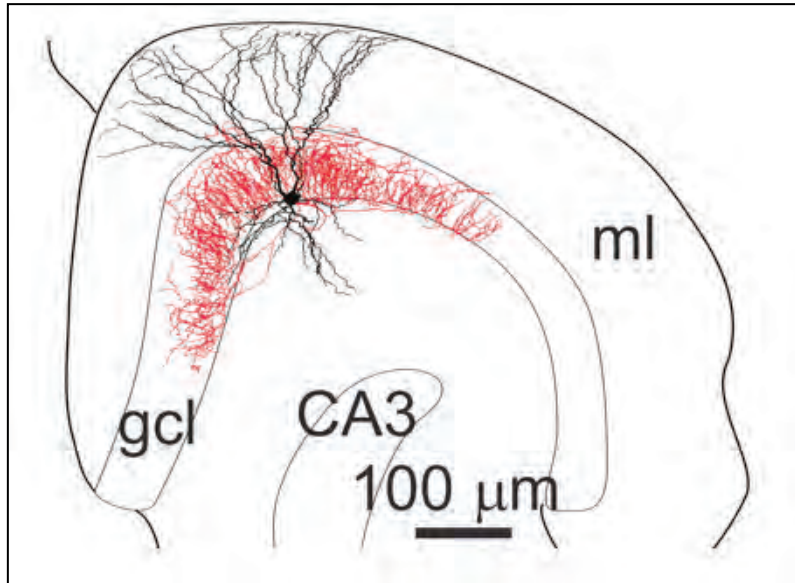


Figure 15 : Reconstruction d'une cellule en panier chez la souris à P21. Le soma et les dendrites sont représentés en noir et l'arborisation axonale en rouge. ml : molecular layer, gcl : granule cell layer.

D'après Doischer et al., 2008.

iii. Cellules axoaxoniques ou cellules chandelier

Le soma des cellules axoaxoniques est situé dans la couche granulaire ou dans le hilus à la frontière avec celle-ci (figures 19 et 20). Leur arbre dendritique, parfois clairsemé de petites épines, est composé de nombreuses branches radiales qui atteignent pour la plupart l'extérieur de la couche moléculaire, et pour les autres le hilus. Leur axone est concentré dans la couche granulaire et forme des contacts synaptiques exclusivement avec les segments initiaux des axones des cellules granulaires. (Kosaka, 1983 ; Soriano and Frotscher, 1989 ; Soriano et al., 1990 ; Halasy and Somogyi, 1993 ; Han et al., 1993 ; Buhl et al., 1994 ; Freund and Buzsaki, 1996 ; DeFelipe, 1999).

iv. Cellules HIPP (Hilar Perforant Path-associated)

Le soma des cellules HIPP se situe dans le hilus et est souvent fusiforme ou multipolaire. Leur arbre dendritique reste souvent confiné à l'intérieur du hilus, il est très ramifié et ses branches sont couvertes de fines épines comparables en densité mais pas en morphologie aux excroissances épineuses des cellules moussues (figures 16, 19 et 20). L'arborisation axonale s'étend dans les deux tiers extérieurs de la couche moléculaire sur une longue partie de l'axe septotemporal du gyrus denté. Les cellules HIPP projettent majoritairement sur les dendrites des cellules granulaires, mais également sur certains interneurons GABAergiques. (Amaral, 1978 ; Han et al., 1993 ; Sik et al., 1997 ; Freund and Buzsaki, 1996 ; Halasy and Somogyi, 1993a ; 1993b ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995a).

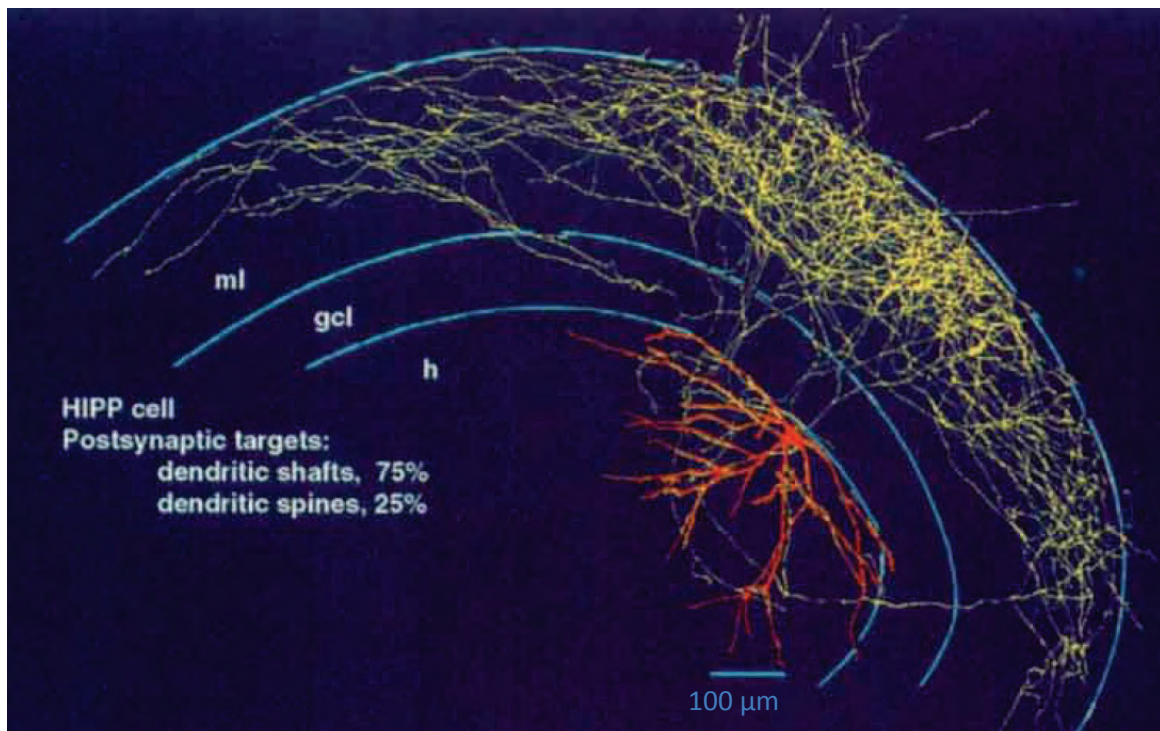


Figure 16 : Reconstruction d'une cellule HIPP. Le soma et les dendrites sont en rouge et l'axone en jaune.

D'après Freund and Buzsaki, 1996.

v. Cellules HICAP (Hilar Commissural-Associational Pathway related)

Le corps cellulaire des cellules HICAP, localisé dans le hilus, est généralement de forme pyramidale. L'arborisation dendritique multipolaire étend ses branches, qui n'ont peu ou pas d'épines, vers le hilus et la couche moléculaire (figures 17, 19 et 20). Les ramifications de l'arborisation axonale des cellules HICAP sont concentrées dans le premier tiers de la couche moléculaire, où elles contactent les dendrites des cellules granulaires. (Han et al., 1993 ; Freund and Buzsaki, 1996 ; Soriano and Frotscher, 1993 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995b ; Sik et al., 1997).

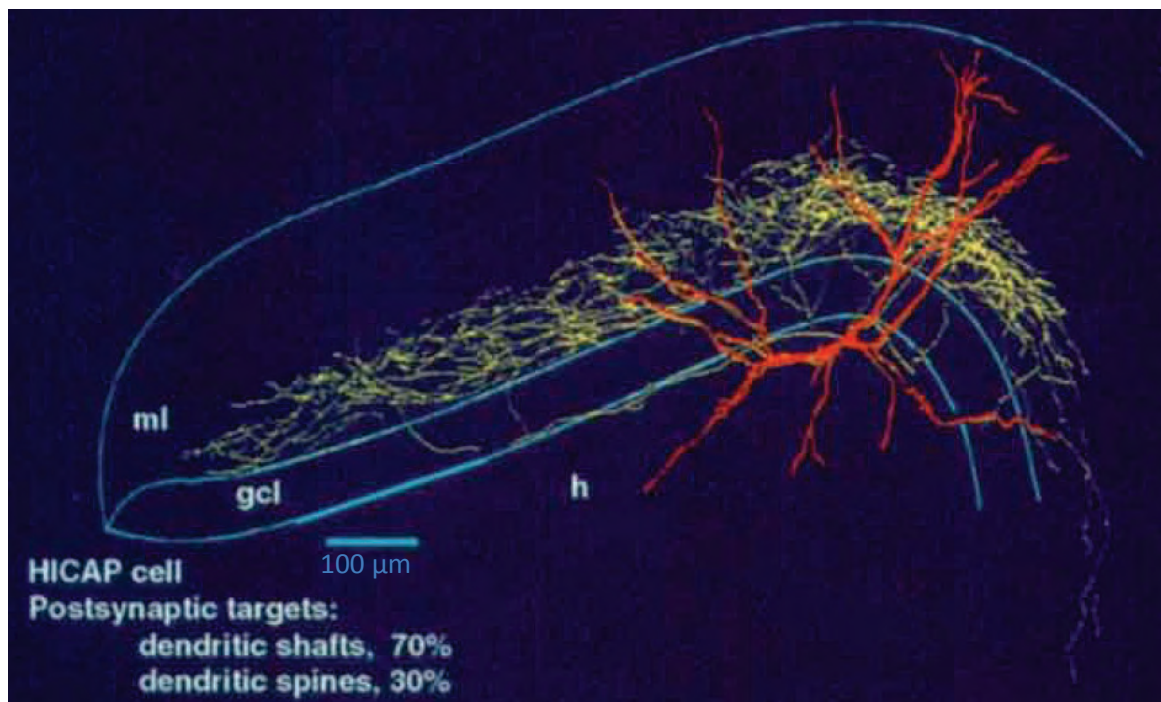


Figure 17 : Reconstruction d'une cellule HICAP. Le soma et les dendrites sont en rouge et l'axone en jaune.

D'après Freund and Buzsaki, 1996.

vi. Cellules MOPP (MOlecular layer Perforant Path-associated cells)

Le soma des cellules MOPP est localisé dans la couche moléculaire. Leurs dendrites sont dépourvues d'épines et généralement situées, tout comme leur arborisation axonale, dans les deux tiers externes de la couche moléculaire, la zone de terminaison de la voie perforante (Halasy and Somogyi, 1993b) (figures 18, 19 et 20).

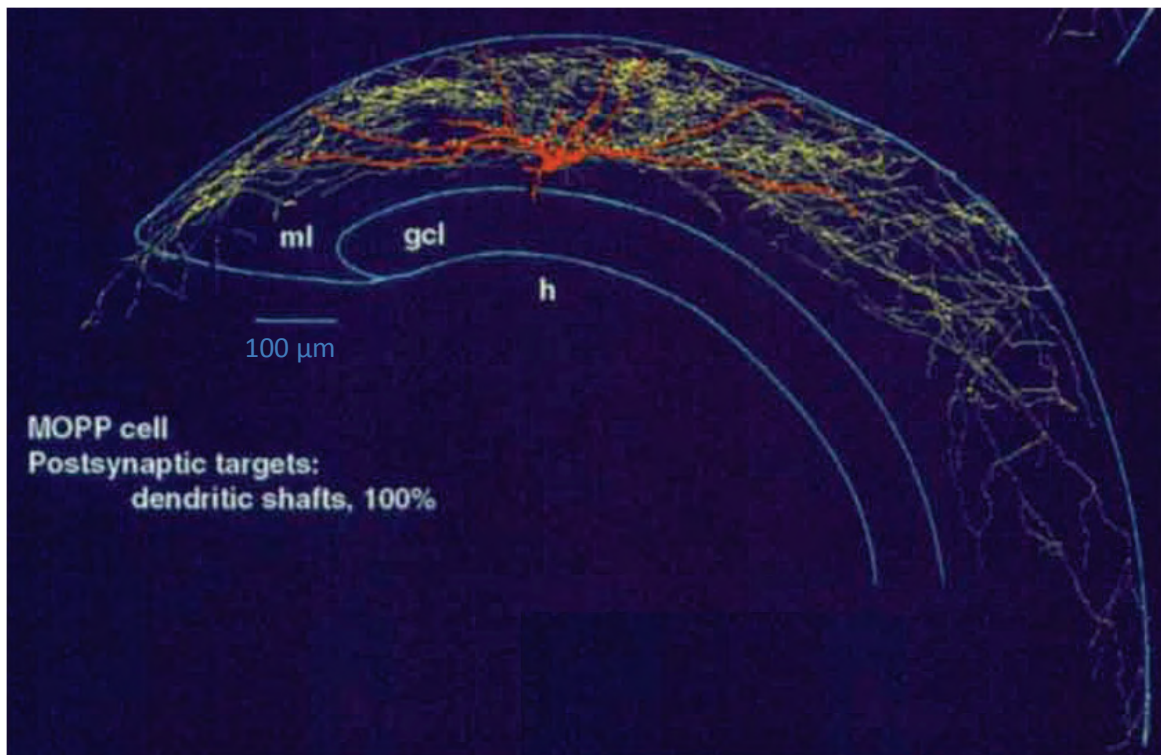


Figure 18 : Reconstruction d'une cellule MOPP. Le soma et les dendrites sont en rouge et l'axone en jaune.

D'après Freund and Buzsaki, 1996.

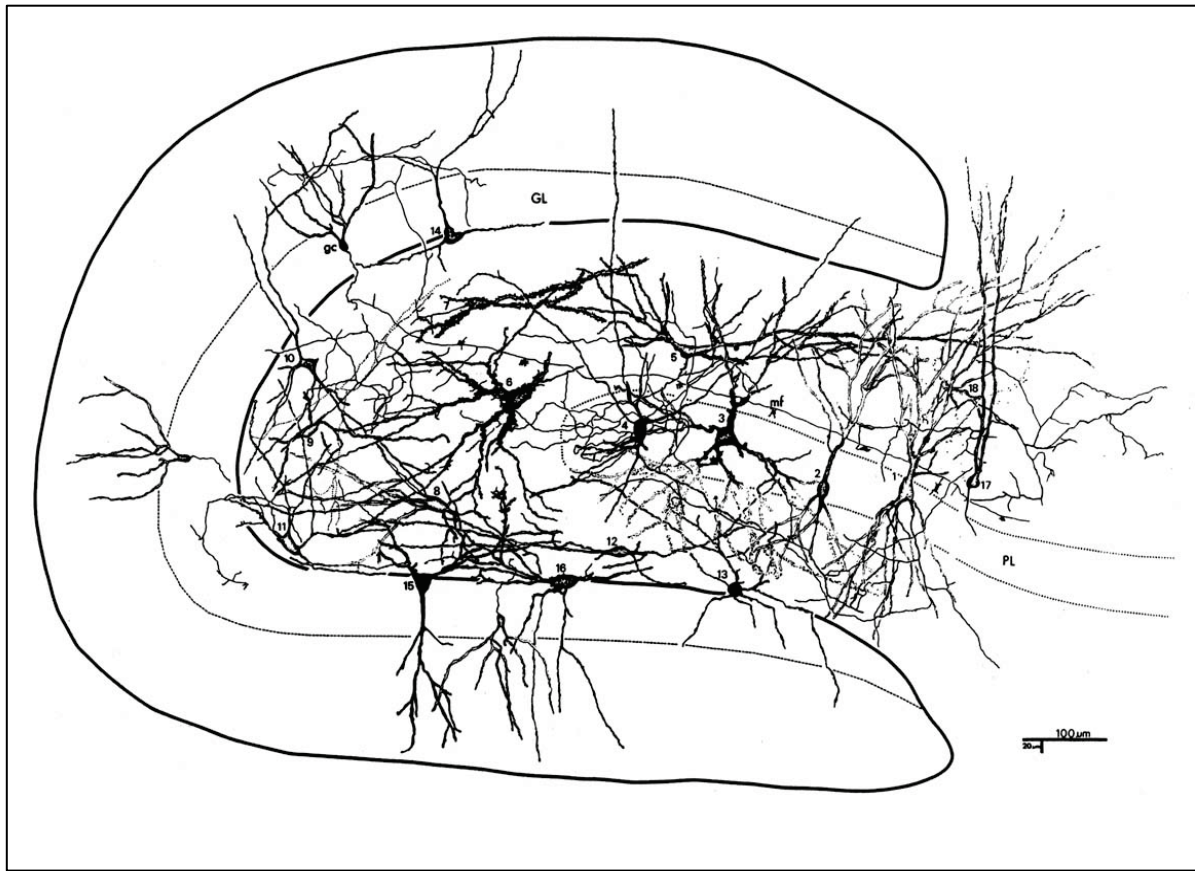


Figure 19 : Neurones du hilus du gyrus denté. Cette figure, réalisée sur la base de marquages par la méthode de Golgi et de dessins à l'aide d'une camera lucida, illustre la diversité des types cellulaires au sein du gyrus denté et de la région proximale du CA3 chez le rat. GL : couche granulaire (« granular layer »), gc : cellule granulaire (« granule cell »), PL : couche pyramidale (« pyramidal layer »), mf : fibre moussue (« mossy fiber »).
D'après Amaral et al., 2007

vii. Autres neurones

D'autres types d'interneurones ont été décrits, notamment des neurones qui contactent sélectivement d'autres interneurones (« IS cells : Interneuron specific cells ») (Gulyas et al., 1996). Le soma de ces neurones ainsi que leur arborisation axonale sont situés dans le hilus.

D'autres neurones qui ressemblent aux neurones trilaminaires ou bistratifiés présents dans le CA1 ont également été mentionnés. Ces neurones ont leur soma dans le hilus, leurs dendrites s'étendent dans le hilus et la couche moléculaire, et leur axone projette vers le CA3 et le subiculum. (Freund and Buzsaki, 1996 ; Sik et al., 1997 ; Gulyas et al., 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995).

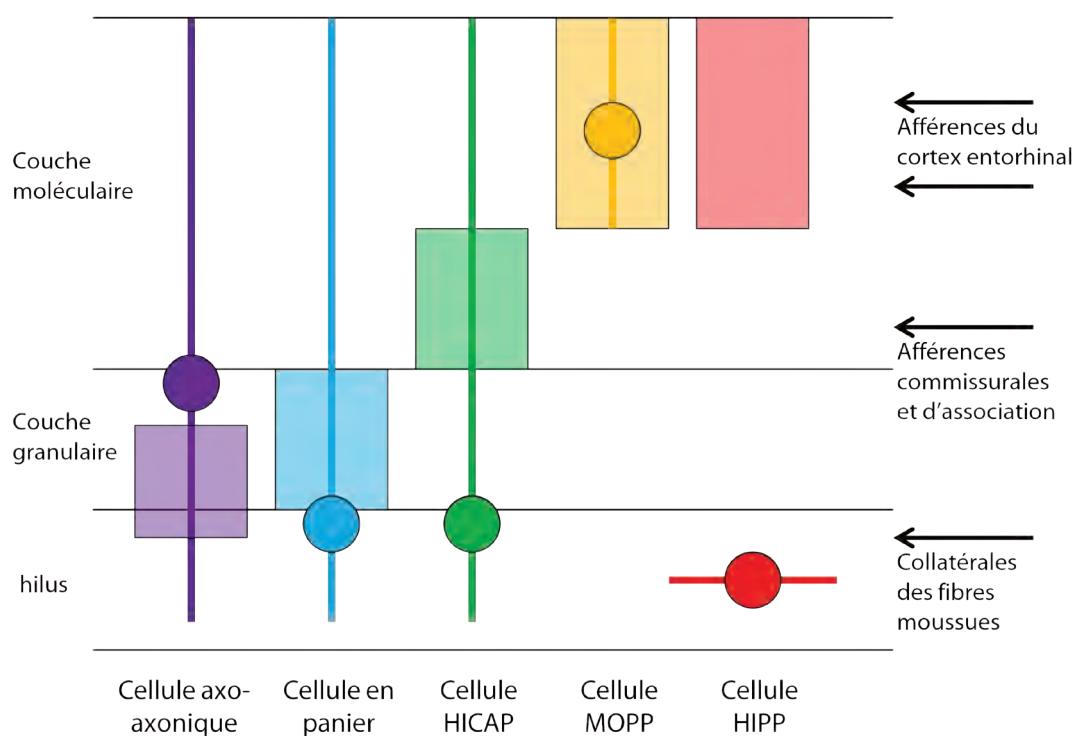


Figure 20 : Classification morphologique des interneurones du gyrus denté. Les ronds représentent les corps cellulaires, les lignes représentent les dendrites, et les rectangles représentent l'arbre axonal.

Adapté d'après Freund and Buzsaki, 1996.

b. Caractéristiques moléculaires des neurones du gyrus denté

Le développement des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation in situ a permis de définir des sous-populations d'interneurones du gyrus denté sur la base de l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques. Ces classifications reposent généralement sur l'expression de trois types de marqueurs (Naegele and Barnstable, 1989 ; Freund and Buzsaki, 1996 ; Cauli et al., 2000) :

- des protéines de liaison du calcium : la calbindine (CB), la parvalbumine (PV) et la calrétinine (CR)
- des neuropeptides : le neuropeptide Y (NPY), le peptide vasoactif intestinal (VIP), la somatostatine (SOM) et la cholecystokinine (CCK)
- des enzymes : l'oxyde nitrique synthétase neuronale (NOS1).

i. Calrétinine (CR)

Les cellules moussues sont les principales cellules glutamatergiques du hilus (Freund and Buzsaki, 1996 ; Soriano and Frotscher, 1994; Wenzel et al., 1997; Fujise et al., 1998). Chez la souris, elles expriment pour la plupart la calrétinine, avec toutefois un gradient de concentration le long de l'axe dorso-ventral, les cellules moussues ventrales étant plus fortement marquées que les dorsales (Liu et al., 1996 ; Blasco-Ibanez and Freund, 1997 ; Fujise et al., 1998 ; Murakawa and Kosaka, 2001 ; Houser, 2007). La calrétinine est en revanche très rarement exprimée par des interneurones GABAergiques dans le hilus (Gulyas et al., 1996 ; Jinno et al., 2002). Par ailleurs elle est un marqueur des cellules générées chez l'adulte dans la couche granulaire (Liu et al., 1996 ; Blasco-Ibanez and Freund, 1997).

ii. Calbindine (CB)

Lorsque les cellules granulaires parviennent à maturité, elles expriment alors la calbindine. Les immunomarquages de la calbindine marquent donc intensément la couche granulaire. Au

contraire, très peu de cellules du hilus expriment cette protéine (Freund and Buzsaki, 1996 ; Jinno et al., 2002).

iii. Parvalbumine (PV)

La majorité des neurones qui expriment la parvalbumine sont situés à l'interface entre le hilus et la couche granulaire ou dans la couche granulaire. Ils ont généralement un corps cellulaire de forme pyramidale et une arborisation axonale qui se ramifie dans la couche granulaire (Ribak et al., 1990 ; Jinno et al., 2002 ; Houser, 2007 ; Freund and Buzsaki, 1996). Il s'agit donc de cellules en panier ou de cellules chandelier. Les neurones qui expriment la PV reçoivent des afférences des fibres mossues qui établissent des contacts synaptiques sur leur soma ou leurs dendrites proximales et leurs dendrites basales (Blasco-Ibanez et al., 2000). Ils reçoivent également des afférences du cortex entorhinal (Zipp et al., 1989). Ainsi les neurones PV peuvent exercer sur les cellules granulaires une action « feedback », lorsqu'ils sont activés par les cellules granulaires qu'ils inhibent, ou « feedforward », lorsqu'ils sont activés par les mêmes afférences du cortex entorhinal que les cellules granulaires qu'ils vont inhiber. Chez la souris, environ 20 à 25% des neurones exprimant la GAD67 (enzyme de synthèse du GABA) expriment la PV (Jinno and Kosaka, 2002).

iv. Neuropeptide Y (NPY)

Le NPY est un marqueur moléculaire très abondant dans les neurones du hilus : 57 à 82% des neurones marqués pour la GAD67 l'expriment (Jinno and Kosaka, 2003b). Les corps cellulaires des neurones NPY sont localisés dans toute la profondeur du hilus, et leurs terminaisons axonales sont situées principalement dans la couche moléculaire extérieure ainsi que dans le hilus (Deller and Leranth, 1990 ; Acsady et al., 2000). Ceci suggère que la plupart des neurones NPY sont des cellules HIPP. Toutefois 3 types de neurones NPY ont été décrits dans le hilus (Kohler et al., 1987 ; Deller and Leranth, 1990). Le premier groupe est constitué de neurones multipolaires au soma

large, avec un arbre dendritique confiné dans le hilus. Le second est composé de neurones multipolaires ou fusiformes au soma un peu moins large et, avec un arbre dendritique pouvant atteindre la couche moléculaire. Enfin, le troisième groupe comporte des neurones situés proches ou dans la couche granulaire, de forme pyramidale, ressemblant à des cellules en panier.

v. Somatostatine (SOM)

La SOM est également un marqueur moléculaire abondant dans le hilus puisqu'environ 55% des neurones l'expriment (Esclapez and Houser, 1995; Buckmaster and Jongen-Relo, 1999; Jinno and Kosaka, 2003). L'arborisation axonale des neurones SOM s'étend dans les deux tiers extérieurs de la couche moléculaire (Bakst et al., 1986 ; Leranth et al., 1990 ; Katona et al., 1999), et leurs dendrites restent souvent confinées dans le hilus. Néanmoins certains neurones SOM projettent au-delà du gyrus denté jusqu'au septum médian (Zappone and Sloviter, 2001 ; Jinno and Kosaka, 2002a). La plupart des neurones SOM situés dans la zone subgranulaire ont un corps cellulaire fusiforme, tandis que ceux situés dans toute la profondeur du hilus sont souvent multipolaires (Freund and Buzsaki, 1996). Par ailleurs, la coexpression de NPY et SOM dans les neurones du hilus est très fréquente (Kohler et al., 1987; Deller and Leranth, 1990, Chan-Palay, 1987; Fu and Van den Pol, 2007; revue Houser, 2007; Jinno and Kosaka, 2003). Pour toutes ces raisons, les neurones SOM sont généralement assimilés aux neurones HIPP des classifications morphologiques (revue Houser, 2007 ; revue Tallent, 2007) : « The correlation of morphology and neurochemical character for this cell type is perhaps the most straightforward of all such attempts; thus, "SOM cells" and "HIPP cells" in the dentate gyrus can be considered as synonymous. » (Freund and Buzsaki, 1996). Cependant, quelques études font cas de neurones SOM fusiformes sans pour autant les apparenter à des neurones HIPP (Ribak and Seress, 1988 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995 ; revue Ribak and Shapiro, 2007).

vi. Cholecystokinine (CCK)

La majorité des neurones qui expriment la CCK sont situés dans la région subgranulaire ou dans la couche granulaire, très peu de neurones CCK se trouvent dans le hilus profond. Leur corps cellulaire est de forme pyramidale, et leur arbre dendritique est composé d'une branche apicale qui se ramifie dans la couche moléculaire, ainsi que d'une ou deux autres branches basales qui s'étendent dans le hilus. Ainsi les neurones CCK reçoivent des afférences de la voie perforante et des fibres moussues. Les terminaisons axonales sont denses dans la couche granulaire et dans la couche moléculaire intérieure et beaucoup plus rares dans le hilus (Freund and Buzsaki, 1996). Les neurones CCK forment une catégorie de cellules en panier distincte des neurones PV (Kosaka et al., 1985 ; Sloviter and Nilaver, 1985 ; Gulyas et al., 1991 ; Acsady et al., 1996 ; Klausberger et al., 2005).

vii. Peptide Vasoactif Intestinal (VIP)

Deux catégories de neurones VIP ont été décrites (Freund and Buzsaki, 1996 ; Hajos et al., 1996 ; Kosaka et al., 1985 ; Sloviter and Nilaver, 1987). Tout d'abord, le VIP est exprimé par une catégorie de cellules en panier, dont certaines expriment également le CCK. Ces neurones ont un soma proche de la couche granulaire, avec un arbre dendritique de type pyramidal ou bitouffu s'étendant dans la couche moléculaire et dans le hilus. Leurs terminaisons axonales ont pour cibles les somas et les dendrites des cellules granulaires. Enfin, le VIP est également exprimé par une seconde catégorie d'interneurones. Ces neurones, moins nombreux, ont un soma localisé dans le hilus profond, et leur arbre dendritique multipolaire s'étend dans le hilus et parfois la couche moléculaire. Les terminaisons axonales sont principalement dirigées vers d'autres interneurones GABAergiques du hilus.

viii. Oxyde Nitrique Synthétase neuronale (NOS1)

La grande majorité des neurones qui expriment la NOS1 sont situés sous la couche granulaire (Valtschanoff et al., 1993 ; Freund and Buzsaki, 1996). Leur morphologie est similaire à celle des cellules en panier. Leur corps cellulaire est fusiforme, rond ou pyramidal, et leurs dendrites apicales traversent la couche moléculaire alors que les dendrites basales restent confinées dans le hilus. Les dendrites des neurones NOS1 sont généralement dépourvues d'épines. Néanmoins il existe également un autre type de neurones NOS1, plus rares, dont les larges corps cellulaires sont situés dans le hilus profond. Leurs arbres dendritiques modérément épineux sont bitouffus ou multipolaires et restent confinés dans le hilus. Qu'il s'agisse du premier ou du second type de neurones NOS1, la localisation de l'axone reste assez imprécise. Il serait situé notamment dans la couche moléculaire. Les neurones NOS1 pourraient d'ailleurs en partie appartenir à la catégorie des neurones HICAP (Freund and Buzsaki, 1996).

c. Classification électrophysiologique des neurones du gyrus denté

Les classifications électrophysiologiques n'ont émergé que tardivement, grâce au développement de la technique de patch-clamp sur tranches assisté par la vidéomicroscopie infrarouge (Stuart et al., 1993). Cette technique a permis d'obtenir de nombreux paramètres quantitatifs permettant de caractériser de manière précise et objective les comportements électrophysiologiques des neurones étudiés. En outre la possibilité d'introduire un marqueur intracellulaire tel que la biocytine dans la pipette d'enregistrement a permis d'établir des corrélations entre les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones enregistrés.

Si la plupart des classifications électrophysiologiques des neurones du gyrus denté décrivent de la même manière les propriétés des cellules principales, les cellules granulaires et moussues, elles ne s'accordent pas toujours sur les classes établies au sein des interneurones GABAergiques. Nous décrivons ici les caractéristiques électrophysiologiques des classes choisies par Lubke (Lubke et al., 1998) : cellules granulaires, cellules moussues, cellules en panier, interneurones épineux du hilus et interneurones non-épineux du hilus.

i. Les cellules granulaires

Les cellules granulaires présentent un potentiel membranaire de repos plus hyperpolarisé que les interneurones et les cellules moussues (Scharfman, 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995 ; Mott et al., 1997 ; Lubke et al., 1998). Elles se distinguent également par des hyperpolarisations (AHPs : « After-HyperPolarizations ») triphasiques (Scharfman, 1992), l'absence de courant rectificateur lors des réponses hyperpolarisantes (Lubke et al., 1998), et une forte adaptation de fréquence de décharge (Scharfman, 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995) (figure 21).

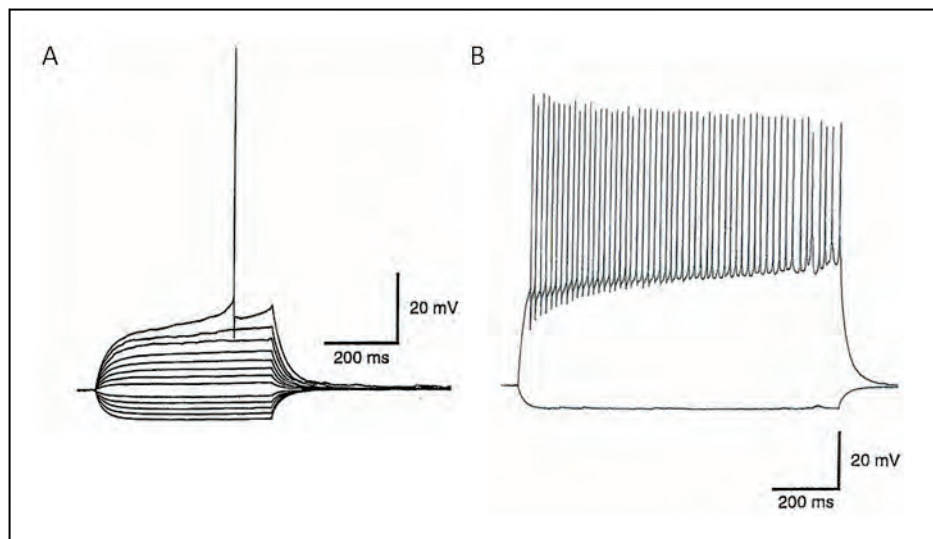


Figure 21 : Physiologie d'une cellule granulaire. A: Réponses en voltage à des injections de courant de -50 à +80 pA par pas de 10 pA. Les réponses de -50 à +50 pA sont moyennées sur 11 à 22 enregistrements; les réponses de +60 à +80 pA sont des enregistrements uniques. $\tau_0 = 31$ ms; largeur à mi-hauteur des potentiels d'action = 0.67 ms. $V_{\text{repos}} = -77$ mV. B: Réponses à des injections de courant de 1s de +250 et -50 pA. La fréquence maximale de décharge (54 Hz) a été observée avec une injection de courant de +250 pA. Sag ratio = 1.0 (réponse à -50 pA). D'après Lubke et al., 1998.

ii. Les cellules moussues

Les cellules moussues déchargent à une fréquence assez faible comparée aux autres neurones du gyrus denté. Elles ont une grande constante de temps, un courant rectificateur important en réponse à des courants hyperpolarisants, et des AHPs de faible amplitude. (Scharfman, 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995 ; Lubke et al., 1998) (figure 22)

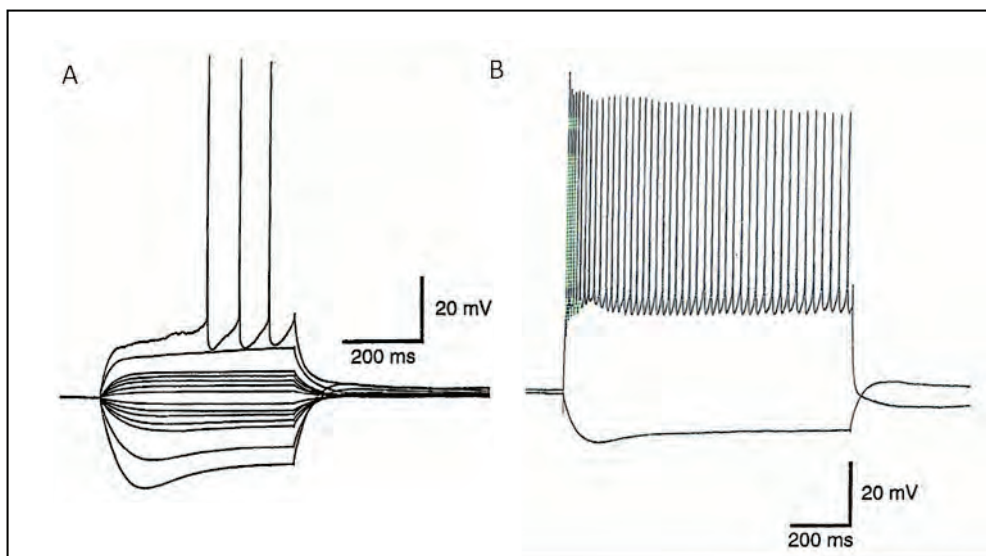


Figure 22 : Physiologie d'une cellule mousse. A: Réponses en voltage à des injections de courant de -150 à $+150$ pA par pas de 50 pA et de -40 à $+40$ pA par pas de 10 pA. Toutes les réponses, hormis celles avec les potentiels d'action, sont moyennées sur 5 à 15 enregistrements. $\tau_0 = 49$ ms; largeur à mi-hauteur des potentiels d'action = 0.89 ms. $V_{\text{repos}} = -64$ mV. B: Réponses à des injections de courant de 1s de $+1000$ et -300 pA. La fréquence maximale de décharge (44 Hz) a été observée avec une injection de courant de $+1000$ pA. Sag ratio = 0.75 (réponse à -300 pA).

D'après Lubke et al., 1998.

iii. Les interneurones du hilus

Les cellules en panier ont la capacité d'émettre des potentiels d'action à très haute fréquence. Ces potentiels d'action ont une durée à mi-hauteur inférieure à celle des potentiels d'action émis par les autres types de neurones. Les cellules en panier présentent une résistance membranaire et une constante de temps très faibles et n'ont pas de courant rectificateur suite à des courants hyperpolarisants (Sik et al., 1997 ; Lubke et al., 1998) (figure 23).

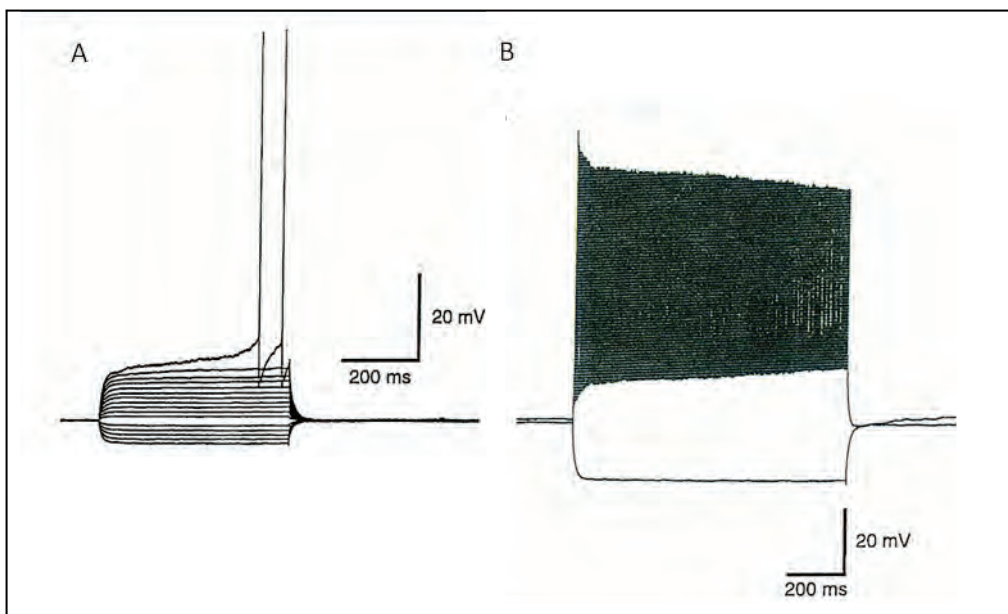


Figure 23 : Physiologie d'une cellule en panier. A: Réponses en voltage à des injections de courant de -100 à $+220$ pA par pas de 20 pA. Toutes les réponses, hormis celles avec les potentiels d'action, sont moyennées sur 4 à 15 enregistrements. $\tau = 11$ ms; largeur à mi-hauteur des potentiels d'action = 0.33 ms. $V_{\text{repos}} = -52$ mV. B: Réponses à des injections de courant de 1s de $+900$ et -300 pA. La fréquence maximale de décharge (266 Hz) a été observée avec une injection de courant de $+900$ pA. Sag ratio = 0.99 (réponse à -300 pA).
D'après Lubke et al., 1998

Les interneurons du hilus avec épines se distinguent des cellules en panier par une fréquence de décharge maximale beaucoup moins élevée, une constante de temps et une résistance membranaire plus faibles. Ils présentent un très fort courant rectificateur en réponse à des courants hyperpolarisants. (Lubke et al., 1998) (figure 24)

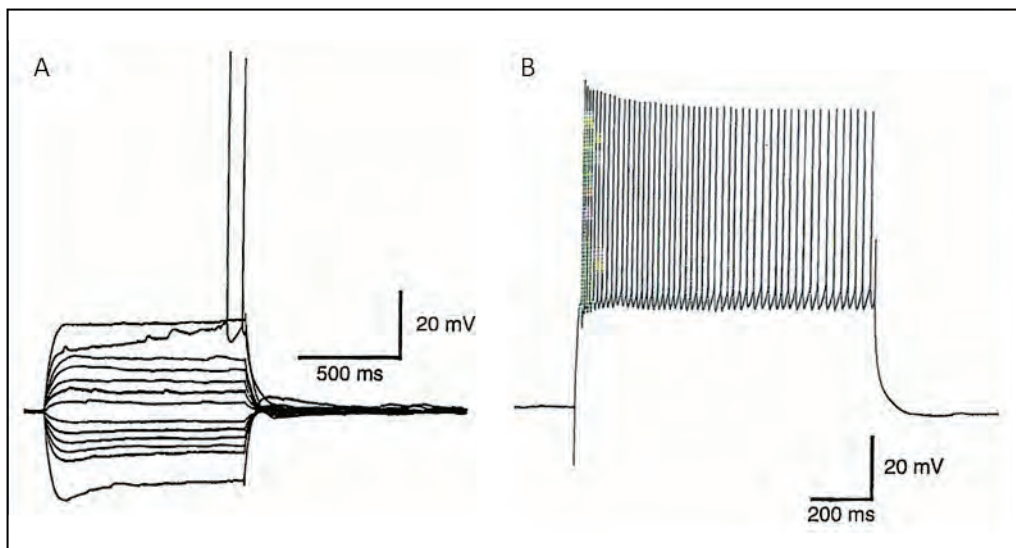


Figure 24 : Physiologie d'un interneurone du hilus avec épines. A: Réponses en voltage à des injections de courant de -100 à $+150$ pA par pas de 50 pA et de -40 à $+40$ pA par pas de 10 pA. Toutes les réponses, hormis celle avec les potentiels d'action, sont moyennées sur 4 à 8 enregistrements. Il est à noter que les potentiels d'action surviennent après une légère rampe en réponse à une injection de courant de $+150$ -pA. La présence d'une dépolarisation initiale plus grande en réponse à une injection de courant de $+100$ pA suggère que l'injection d'un courant de $+150$ pA active un courant K^+ . Celui-ci s'inactive lentement, induisant une rampe dépolarisante en réponse à l'injection de courant de $+150$ -pA. B: Réponse à une injection de courant de 1s de $+800$ pA. La fréquence maximale de décharge (70 Hz) a été observée avec une injection de courant de $+800$ pA. $\tau_0 = 35$ ms; largeur à mi-hauteur des potentiels d'action = 0.87 ms; sag ratio = 0.81 (réponse à -100 pA). $V_{\text{repos}} = -71$ mV.

D'après Lubke et al., 1998.

Les interneurons dépourvus d'épines déchargent leurs potentiels d'action à des fréquences beaucoup moins élevées que les cellules en panier, et ont une résistance membranaire et une constante de temps plus importantes. En outre, ils possèdent une grande capacité d'adaptation de fréquence. Par ailleurs ils présentent un fort courant rectificateur en réponse à des courants hyperpolarisants, ce qui permet de les distinguer des cellules granulaires et des cellules en panier. En général, leurs AHPs sont de longue durée. (Lubke et al., 1998) (figure 25)

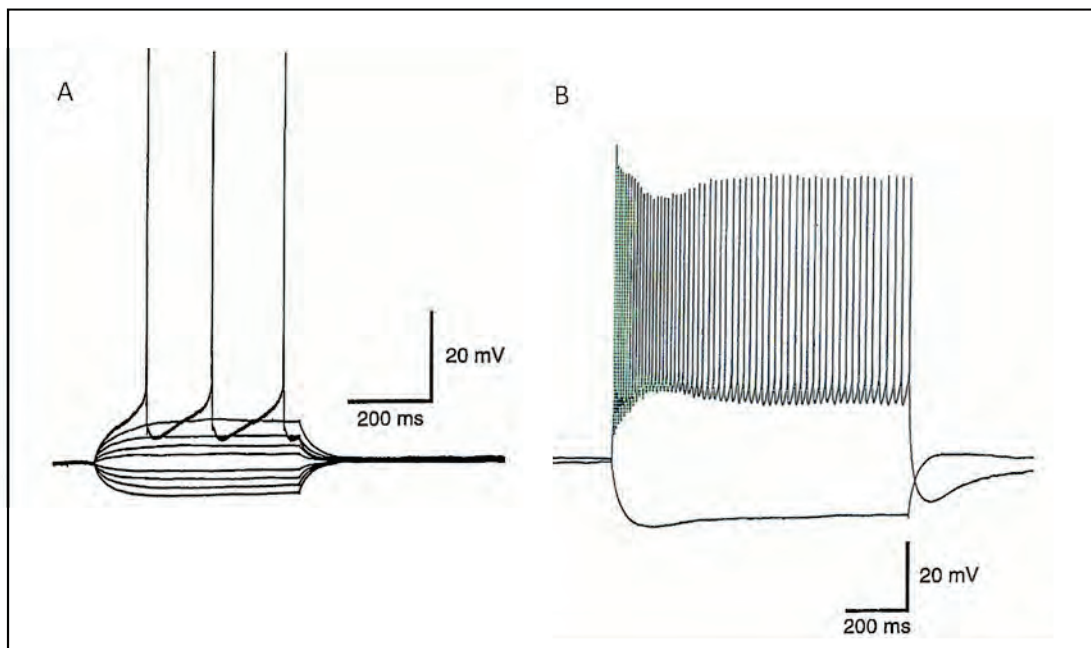


Figure 25 : Physiologie d'un interneurone du hilus dépourvu d'épines. A: Réponses en voltage à des injections de courant de -20 à $+25$ pA par pas de 5 pA. Toutes les réponses, hormis celles avec les potentiels d'action, sont moyennées sur 4 à 5 enregistrements. $\tau_0 = 40$ ms; largeur à mi-hauteur des potentiels d'action = 0.55 ms. B: Réponses à des injections de courant de 1s de $+200$ and -50 pA. La fréquence maximale de décharge (58 Hz) a été observée avec une injection de courant de $+200$ -pA. Sag ratio = 0.84 (réponse à -50 pA). $V_{\text{repos}} = -59$ mV.

D'après Lubke et al., 1998.

d. Connectivités au sein du gyrus denté

En prenant en compte les types cellulaires définis par les critères morphologiques (cellules granulaires, cellules moussues, cellules en panier, cellules axo-axoniques, cellules HIPP, cellules HICAP, cellules MOPP et cellules IS), les connections entre les cellules du gyrus denté peuvent être résumées comme suit (figure 26) (Morgan et al., 1997).

Les fibres moussues (axones des cellules granulaires) sont principalement confinées dans le hilus où elles établissent des connections avec tous les types cellulaires présents, c'est-à-dire tous les autres à l'exception des cellules MOPP. Les cellules moussues, second type de neurones excitateurs, projettent leur arborisation axonale dans toutes les couches du gyrus denté et contactent tous les autres types cellulaires hormis les cellules IS.

Les interneurones, quant à eux, peuvent avoir un rôle de signalisation en « feedback » ou « feedforward » vers les cellules granulaires. Les cellules MOPP, localisées dans la couche moléculaire et donc recevant des afférences excitatrices de la voie perforante, sont idéalement placées pour exercer une inhibition en « feedforward » sur les dendrites des cellules granulaires. Les autres interneurones, localisés dans le hilus et par conséquent fortement sollicités par les fibres moussues, exercent leur action inhibitrice en « feedback » soit au niveau des dendrites soit au niveau du soma ou des segments initiaux de l'axone des cellules granulaires.

Enfin, les interneurones IS ont un rôle un peu particulier. Comme ils reçoivent des afférences des fibres moussues et contactent sélectivement des interneurones du hilus, ils permettent de réguler plus finement l'action inhibitrice exercée par les interneurones du hilus vis-à-vis des cellules granulaires.

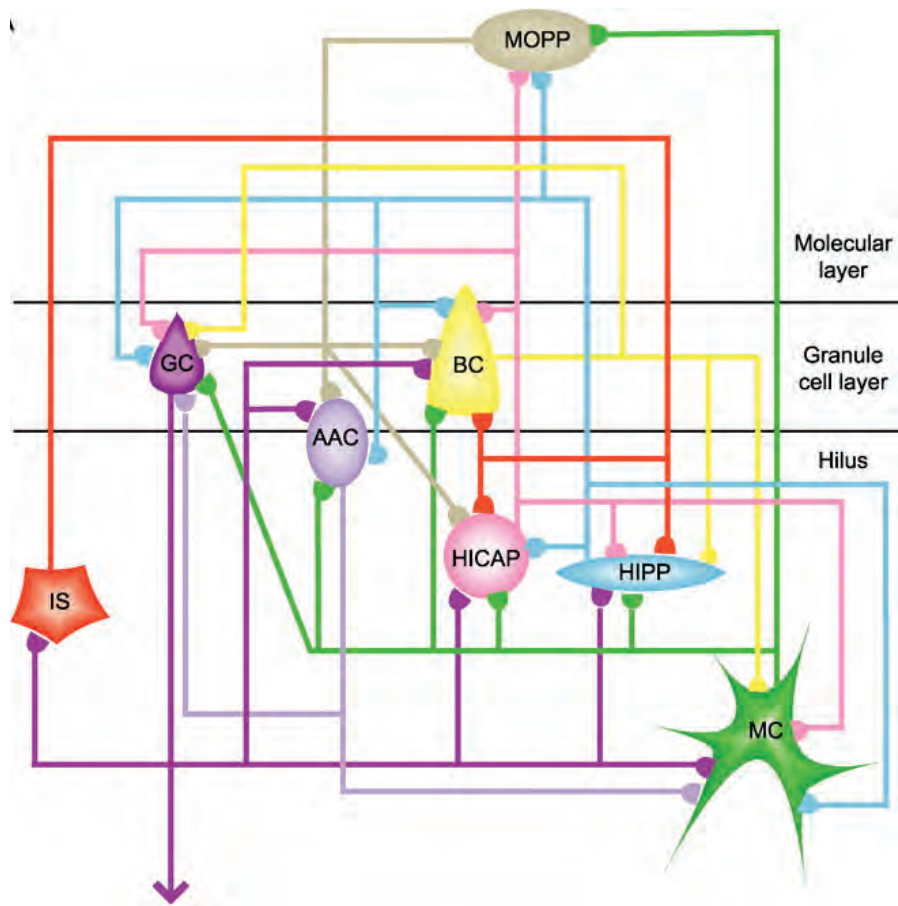


Figure 26 : Schéma des connectivités au sein du gyrus denté. Le schéma montre les localisations caractéristiques des huit principaux types cellulaires identifiés dans les trois couches du gyrus denté, ainsi que leurs connexions. Le diagramme n'indique cependant pas la topographie de la connectivité axonale ni la localisation somato-dendritique des synapses. GC : cellule granulaire, BC : cellule en panier, MC : cellule moussue, AAC : cellule axo-axonique, MOPP : cellule MOPP, HIPP : cellule HIPP, HICAP : cellule HICAP, IS : cellule connectant spécifiquement des interneurons.

D'après Morgan et al., 2007.

Ainsi, les relations complexes qu'entretiennent les neurones du gyrus denté entre eux permettent une régulation assez fine des échanges avec les cellules granulaires. Cette régulation est d'ailleurs primordiale pour le bon déroulement des étapes de maturation et d'intégration des nouvelles cellules granulaires générées tout au long de la vie dans le gyrus denté.

3. Neurogénèse hippocampique adulte

Chez les mammifères, et notamment chez l'Homme, la neurogénèse adulte a lieu de manière constitutive dans deux régions du cerveau : le gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (Altman and Das, 1965 ; Kaplan and Hinds, 1977 ; Eriksson et al., 1998). Dans le gyrus denté, les nouveaux neurones sont produits dans la région sous-granulaire, puis migrent dans la couche granulaire où ils vont suivre un processus de maturation et d'intégration au réseau neuronal existant. Des estimations chez le rat suggèrent qu'environ 6% de la couche granulaire est constituée de neurones nouvellement générés (Cameron and McKay, 2001).

a. Méthodologies

Différentes approches expérimentales existent pour visualiser et analyser la neurogénèse hippocampique chez la souris (figure 27) :

- L'incorporation d'analogues nucléotidiques comme le BrdU (bromodéoxyuridine)
- L'injection d'un retrovirus, qui va s'insérer dans les cellules en phase G2 ou S du cycle cellulaire
- Les immunomarquages de gènes spécifiques des neurones immatures ou les souris transgéniques (POMC-GFP, ...)

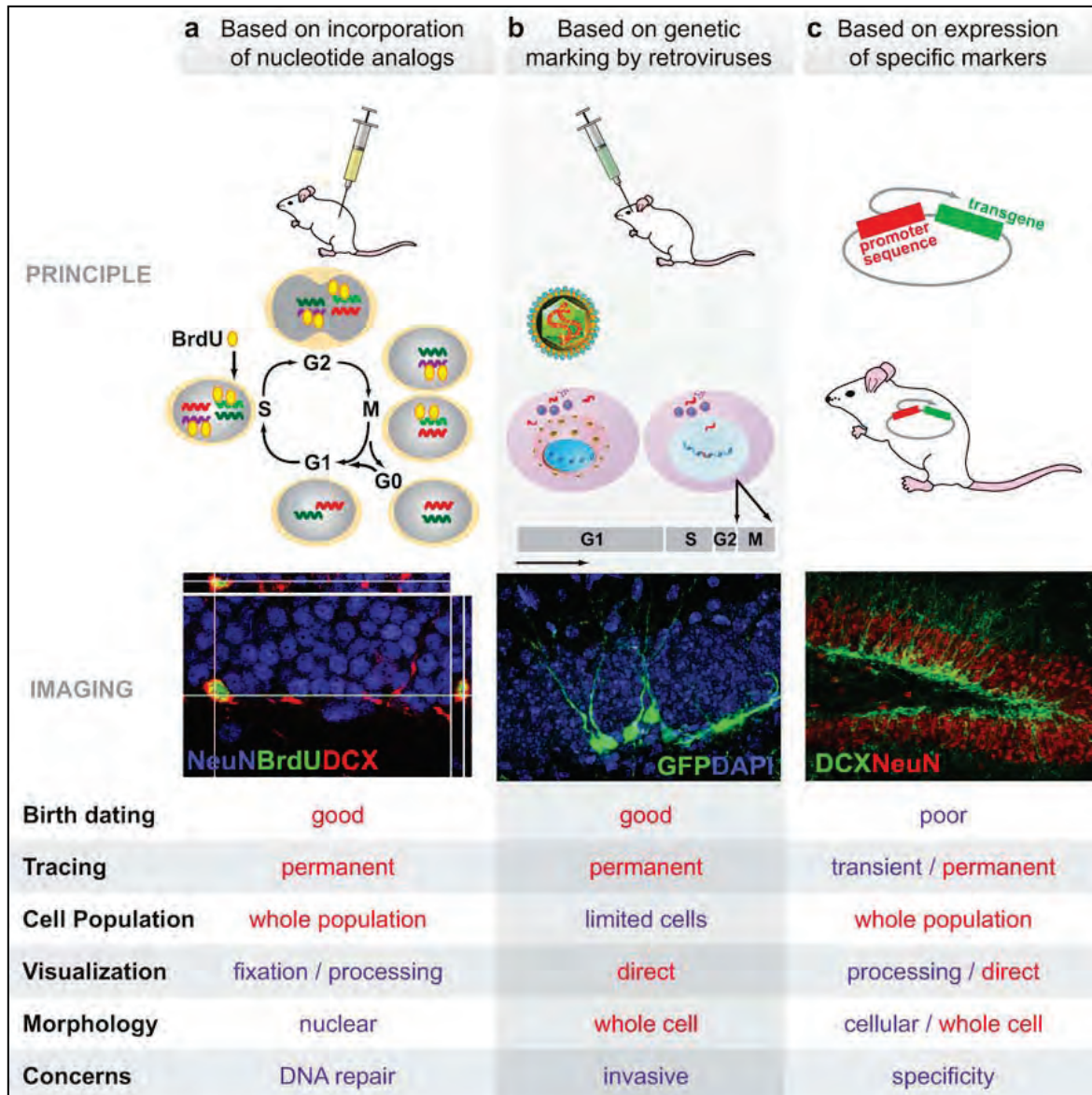


Figure 27 : Méthodologies pour l'analyse de la neurogénèse adulte in vivo. (a) Analyse basée sur l'incorporation d'analogues nucléotidiques au cours de la réplication de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire. L'image en microscopie confocale montre la colocalisation de la bromodeoxyuridine (BrdU) et des marqueurs cellulaires spécifiques. (b) Analyse basée sur un marquage rétroviral. L'image montre l'expression de la GFP (green fluorescent protein) dans des cellules nouvellement générées 2 semaines après une injection stéréotaxique de rétrovirus dans la région du hilus chez la souris. (c) Analyse basée sur l'expression de marqueurs spécifiques des neurones immatures. Des souris transgéniques exprimant des gènes rapporteurs sous le contrôle de promoteurs spécifiques peuvent également être générées. L'image montre l'expression de marqueurs de neurones immatures (DCX) et de neurones matures (NeuN) dans le gyrus denté de l'hippocampe chez la souris.

D'après Ming and Song, 2005

b. Différentes phases

i. Cellules souches

L'identité des cellules souches neurales a fait l'objet de nombreux débats au cours des dernières décennies. Plusieurs types cellulaires ont été proposés : astrocytes (Seri et al., 2001), cellules épendymaires (Johansson et al., 1999) ou cellules sous-épendymaires (Morshead et al., 1994). L'hypothèse astrocytaire semble aujourd'hui la plus plausible (Seri et al., 2001 ; Filippov et al., 2003 ; revue Kempermann et al., 2004). Les cellules gliales radiales, un sous-type d'astrocytes, se trouvent dans la zone sous-granulaire, à l'interface entre le hilus et la couche granulaire (figure 27). Elles expriment la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ainsi que la nestine et ont un comportement électrophysiologique similaire à celui des astrocytes (Filippov et al., 2003 ; Fukuda et al., 2003). Ces cellules, aussi appelées cellules de type 1, prolifèrent pour donner lieu soit à des cellules progénitrices, soit à des astrocytes qui vont exprimer S100 β en plus de la GFAP (Steiner et al., 2004).

ii. Cellules progénitrices

Dans la voie de différenciation neuronale, les progéniteurs, ou cellules de type 2 (figure 28), s'accumulent pour former des clusters (revue Parent, 2007). Ils n'expriment plus la GFAP mais continuent à proliférer et commencent à migrer tangentiellement (Kuhn et al., 1996). La forme de leur noyau est irrégulière. Les cellules de type 2 peuvent être divisées en cellules de type 2a et 2b selon qu'elles expriment ou non la doublecortine (DCX) (Brown et al., 2003). Un petit nombre de cellules de type 2 est capable de générer des courants sodiques, ce qui traduit bien un engagement dans la voie neuronale (Filipov et al., 2003).

Les cellules de type 3 (figure 28), également appelées neuroblastes, sont un peu plus avancées dans le processus de maturation neuronale. Elles ont un noyau de forme ronde et expriment toutes la DCX et la PSA-NCAM, une molécule d'adhésion (Seki, 2002).

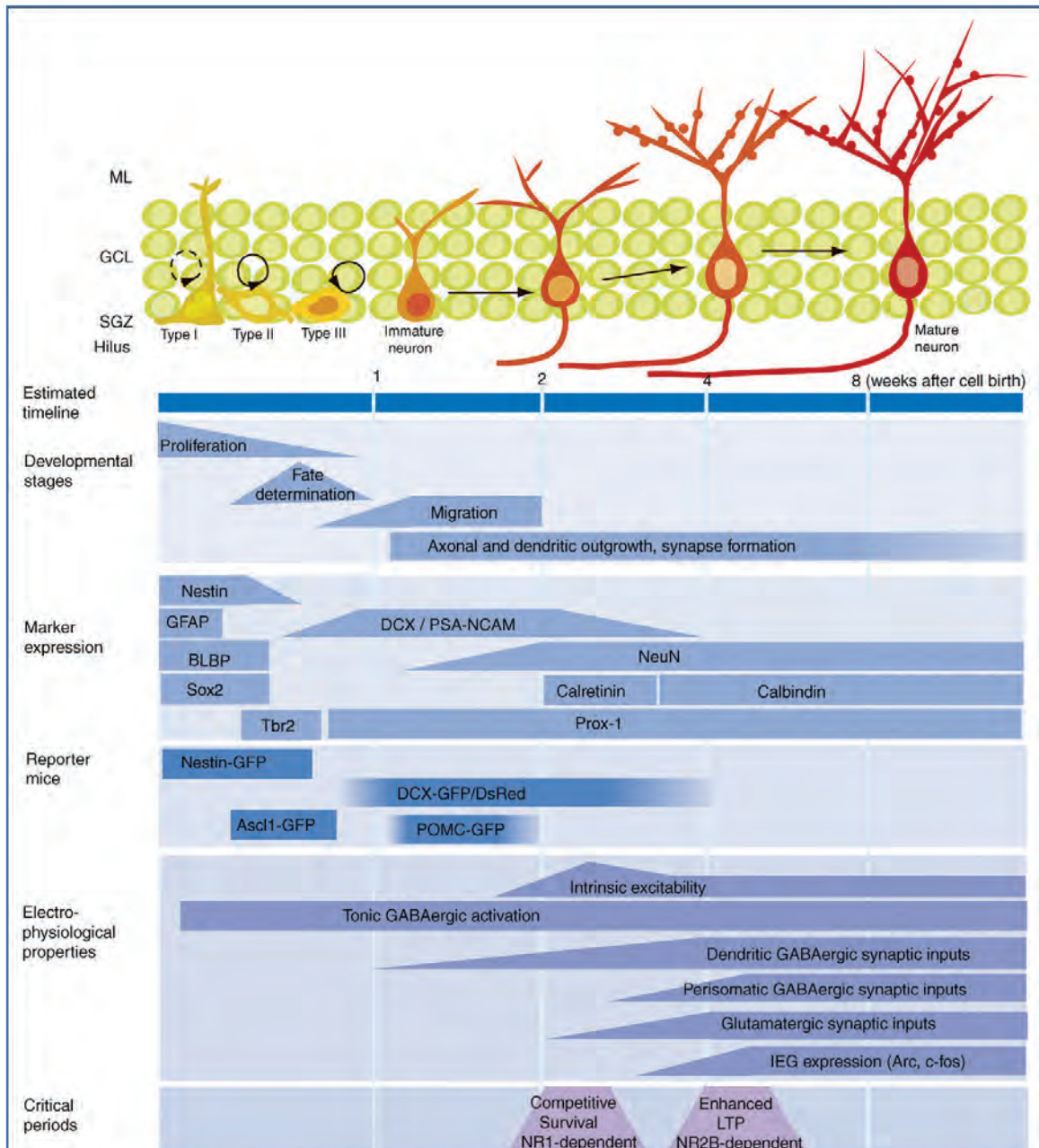


Figure 28 : Neurog nese adulte dans le gyrus denté de l'hippocampe. Résumé des connaissances actuelles sur les cellules souches neurales : chronologie, phases développementales, expression de marqueurs spécifiques, propriétés physiologiques, périodes critiques, et mécanismes moléculaires potentiels. ML, molecular layer; GCL, granule cell layer; SGZ, subgranular zone; GFAP, glial fibrillary acidic protein; BLBP, brain lipid-binding protein; DCX, doublecortin; NeuN, neuronal nuclei; PSANCAM, the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule NCAM; POMC, pro-opiomelanocortin; IEG, immediate early gene; LTP, long-term potentiation; TXL, tailless; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; GABA, g-aminobutyric acid; DISC1, disrupted-in-schizophrenia 1.

D'après Duan et al., 2008.

Les cellules progénitrices sont activées toniquement par le GABA ambiant. A ce stade de développement, le transporteur du chlore le plus fortement exprimé est le NKCC1. NKCC1 étant un importateur de chlore, la concentration intracellulaire de chlore est élevée et le GABA est dépolarisant (Ge et al., 2006).

iii. Cellules granulaires immatures

Trois jours après la division initiale, près de deux tiers des cellules atteignent déjà un stade post-mitotique (revue Kempermann et al., 2004). Les cellules suivent alors un processus de sélection au terme duquel elles vont être soit recrutées soit éliminées. La survie de ces cellules dépend en partie de l'expression de la sous-unité NR1 des récepteurs du glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Le nombre de nouvelles cellules diminue donc fortement avant de se stabiliser environ deux semaines et demi après les premières divisions (Kempermann et al., 2003). Elles expriment le marqueur neuronal NeuN et la calrétinine, protéine de liaison au calcium. Leur noyau est de forme ronde ou légèrement triangulaire. Une dendrite apicale apparaît et l'axone commence à se développer (Zhao et al., 2006). Elles poursuivent leur migration tangentielle.

A ce stade les neurones commencent à recevoir des afférences GABAergiques synaptiques au niveau des dendrites, puis des afférences glutamatergiques synaptiques (Overstreet-Wadiche et al., 2005 ; Esposito et al., 2005).

Par ailleurs, l'expression de KCC2 augmente graduellement tandis que celle de NKCC1 diminue. KCC2 étant un exportateur de chlore, la concentration intracellulaire de chlore diminue et le GABA devient hyperpolarisant (Ge et al., 2006) (figure 28).

iv. Cellules granulaires matures

Environ deux à trois semaines après avoir atteint un stade post-mitotique, les cellules se mettent à exprimer la calbindine plutôt que la calrétinine. La calbindine est exprimée dans toutes les cellules granulaires matures, mais ne constitue pas à elle seule un marqueur de maturation. Il faut en effet entre quatre et sept semaines pour que les nouveaux neurones soient considérés comme fonctionnels (Van Praag et al., 2002). A ce stade, le soma des cellules est rond, l'axone s'étend vers le hilus et les dendrites épineuses se ramifient dans la couche moléculaire (Esposito et al., 2005 ; Zhao et al., 2006). Les neurones commencent à recevoir des afférences GABAergiques perisomatiques (Overstreet-Wadiche et al., 2005 ; Esposito et al., 2005). Les cellules migrent petit à petit radialement dans la profondeur de la couche granulaire. Par ailleurs, il existe une période critique pendant laquelle la potentialisation à long terme (LTP) des neurones est amplifiée. Cette potentialisation dépend de l'expression de la sous-unité NR2B des récepteurs du glutamate de type NMDA, et elle intervient à un âge compris entre quatre et six semaines (Schmidt-Hieber et al., 2004 ; Ge et al., 2007). Le seuil d'induction de la LTP est réduit tandis que l'amplitude de la réponse est augmentée en réponse à une stimulation. (figure 28)

Au terme de ce processus de maturation, les cellules deviennent parfaitement fonctionnelles et indiscernables des cellules granulaires matures voisines (Jessberger and Kempermann, 2003 ; Laplagne et al., 2006 ; Ge et al., 2007).

4. Maladies neurodégénératives affectant l'hippocampe

De nombreuses maladies touchent l'hippocampe, cependant nous n'aborderons que la maladie d'Alzheimer et l'épilepsie. L'incidence de la maladie d'Alzheimer est particulièrement élevée et en forte progression chez les personnes âgées, devenant ainsi une préoccupation importante de notre société. A l'origine, mon projet de thèse a été pensé pour travailler ensuite sur des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, c'est pourquoi nous nous intéresserons plus particulièrement à cette maladie qui induit par ailleurs fréquemment une activité épileptique.

a. Epilepsie

i. Présentation générale de l'épilepsie

L'épilepsie est restée longtemps une affection neurologique mal comprise, déformée par les mythes et la peur. Elle a touché des personnages célèbres comme Napoléon, Alfred Nobel ou encore Jules César. L'origine de son nom vient de « epilambanein » qui signifie en grec ancien « prendre par surprise ». Ce n'est qu'à partir du 19^e siècle, avec la neurologie qui a commencé à s'imposer comme une discipline distincte de la psychiatrie, qu'a émergé l'idée que l'épilepsie est un désordre cérébral. En 1873 John Hughlings Jackson, neurologue britannique, a émis l'hypothèse que les crises d'épilepsie étaient provoquées par des décharges électrochimiques brutales d'énergie dans le cerveau, et que le caractère de ces crises était lié à l'emplacement et à la fonction du site des décharges (Loiseau et Jallon, 1984). A partir des années 1920, le développement de l'EEG (électroencéphalographie) a permis de localiser les sites de décharge épileptique qui provoquent des crises et d'envisager des traitements neurochirurgicaux, devenus bien plus courants à partir des années 1950.

ii. Epilepsie et gyrus denté

Dans un cerveau épileptique, le réseau neuronal présente une hyperexcitabilité due à un « sprouting » ou bourgeonnement de l'arborisation axonale des cellules granulaires, les fibres moussues (Houser et al., 1999 ; Gutierrez and Heinemann, 1999 ; Wenzel et al., 2000). Plusieurs types d'hypothèses existent pour expliquer ce phénomène (figure 29).

Tout d'abord, certaines hypothèses sont centrées sur le rôle des cellules moussues dans l'épilepsie. La première est l'hypothèse de « sprouting » ou bourgeonnement" des fibres moussues induit par la perte des cellules moussues qui sont les cellules excitatrices glutamatergiques du hilus. Les fibres moussues des cellules granulaires innervent fortement les cellules moussues et la perte de ces cellules pourrait être la clef de déclenchement de la germination ou de la poussée des fibres moussues (Masukawa et al., 1999).

La seconde hypothèse est celle des « dormant basket cells » ou cellules en panier au repos. Les « basket cells » ne sont plus activées par les cellules moussues excitatrices et deviennent hypoactives (Sloviter, 1987, 1991; Bekenstein and Lothman, 1993 ; Jefferys and Traub, 1998).

La troisième hypothèse, celle des cellules moussues « irritables » met en avant la survie des cellules moussues (Santhakumar et al., 2000), créant une hyperexcitabilité des cellules granulaires. Les cellules moussues subiraient des changements persistants de leurs propriétés intrinsèques ou synaptiques, ce qui augmenterait leur réponse aux entrées excitatrices (Scharfman et al., 2001).

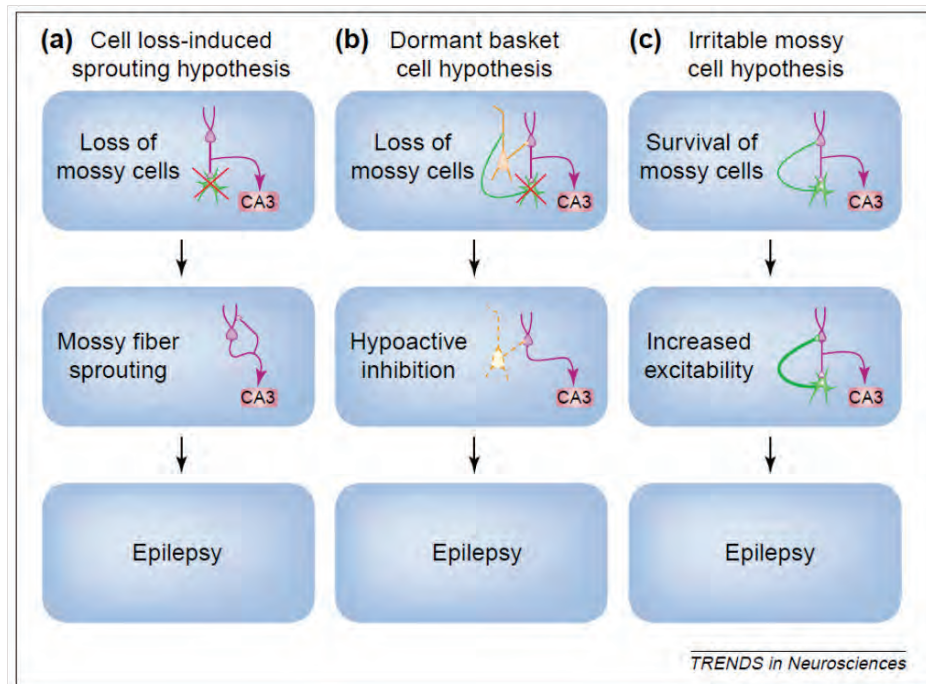


Figure 29 : 3 hypothèses concernant le rôle des cellules moussues dans l'épilepsie.

D'après Ratzliff et al., 2002.

Cependant, il n'a pas été mis en évidence que ce soit spécifiquement la perte des cellules moussues, par opposition à la perte d'interneurones du hilus, qui déclenche cette germination des fibres moussues. Le second type d'hypothèse penche vers cette dernière solution et propose que l'hyperexcitabilité du gyrus denté soit liée à une perte des neurones GABAergiques (Gorter et al., 2001 ; Cossart et al., 2001 ; Ratzliff et al., 2004 ; De Lanerolle et al., 1989 ; Mathern et al., 1995 ; Sloviter, 1987 ; Lowenstein et al., 1992 ; Sperk et al., 1992 ; Schwarzer et al., 1995 ; Houser and Esclapez, 1996 ; Magloczky and Freund, 1993 ; Mitchell et al., 1995 ; Buckmaster et al., 2002 ; Zhang et al., 2009 ; Sutula and Dudek, 2007).

Par ailleurs, l'activité épileptique influence la neurogénèse hippocampique. La production à l'âge adulte de nouveaux neurones augmente dans des modèles d'épilepsie temporelle chez le rongeur (Parent et al., 1997, 1998 ; Bengzon et al., 1997 ; Gray and Sundstrom, 1998 ; Scott et al., 1998 ; Nakagawa et al., 2000). Ces nouveaux neurones contribuent, avec les neurones préexistants, à la

réorganisation axonale aberrante de l'hippocampe (Parent et al., 1997, 1999). Les crises épileptiques perturbent également la migration des progéniteurs et conduisent à une distribution ectopique de cellules granulaires dans le hilus (Houser, 1990 ; Scharfman et al., 2000 ; Dashtipour et al., 2001 ; Jung et al., 2004 ; Parent et al., 2006 ; Parent and Kron, 2012).

b. Maladie d'Alzheimer

i. Présentation générale de la maladie d'Alzheimer

Au début du 20^e siècle, Alois Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand, a étudié le cerveau de personnes atteintes de démence en utilisant des nouvelles techniques de coloration à l'aniline et des imprégnations argentiques. En 1907, en observant le cerveau d'Auguste D., une patiente de 51 ans atteinte de démence et présentant des hallucinations visuelles et des troubles de l'orientation, il a décrit pour la première fois les altérations anatomiques de cette maladie. C'est le psychiatre renommé Emil Kraepelin (1856-1926), qui est à l'époque responsable de la chaire de psychiatrie de Munich, qui propose par la suite de désigner ce type de démence par le nom de son collègue en 1910.

Les patients atteints de cette maladie présentent une forte atrophie corticale, notamment au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal (Toledo-Morrell et al., 2007). La maladie engendre un déclin progressif des capacités cognitives et mnésiques. D'un point de vue neuroanatomique, le cerveau malade est victime d'un processus de dégénérescence et d'inflammation qui va toucher le cortex entorhinal et l'hippocampe avant de se propager progressivement à l'ensemble du cerveau. La maladie d'Alzheimer se caractérise toujours par la présence de deux lésions histopathologiques : les corps neurofibrillaires et les plaques séniles ou amyloïdes (figure 30).

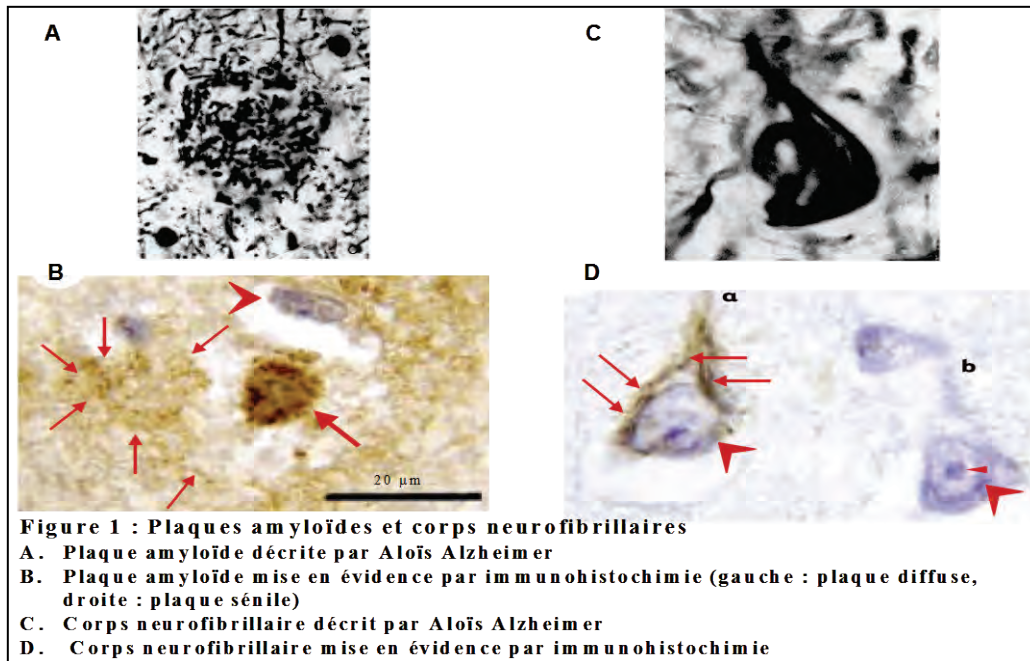


Figure 30 : Plaques amyloïdes et corps neurofibrillaires. A. Plaques amyloïdes décrites par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique. B. Plaques amyloïdes mises en évidence par immunomarquage (Duyckaerts et al., 2009). C. Corps neurofibrillaires décrits par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique. D. Corps neurofibrillaires mis en évidence par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine Tau.

Les plaques séniles contiennent le peptide amyloïde (A β). Celui-ci se forme suite à des clivages successifs du précurseur APP (A β -containing precursor protein) par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase (LaFerla et al., 2007, figure 31). L'augmentation d'A β dans le cerveau des patients atteints de la maladie serait le facteur déclencheur qui conduit à la pathologie à travers différentes étapes (figure 32). Ainsi, l'activation astrocytaire, le stress oxydatif, la formation des corps neurofibrillaires, le dysfonctionnement synaptique et finalement la perte neuronale seraient un enchaînement d'événements dont l'unique raison proviendrait du déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide amyloïde (Hardy and Allsop, 1991).

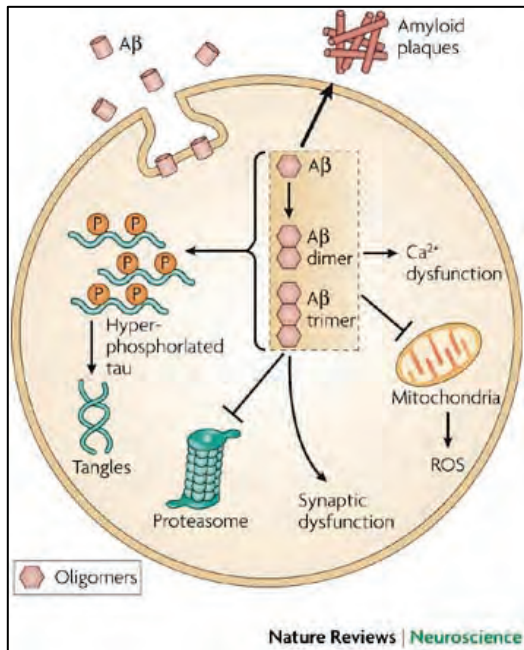


Figure 31 : Le peptide amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer. Le peptide amyloïde β ($A\beta$) est produit à l'intérieur de la cellule ou capté à l'extérieur de la cellule. Au niveau intracellulaire, $A\beta$ peut exister sous forme de monomère ou d'oligomère. Il contribuerait à la pathologie en facilitant l'hyperphosphorylation de la protéine tau, le dysfonctionnement des protéasomes, des mitochondries, du calcium et des synapses. ROS : « reactive oxygen species ».

D'après LaFerla et al., 2007.

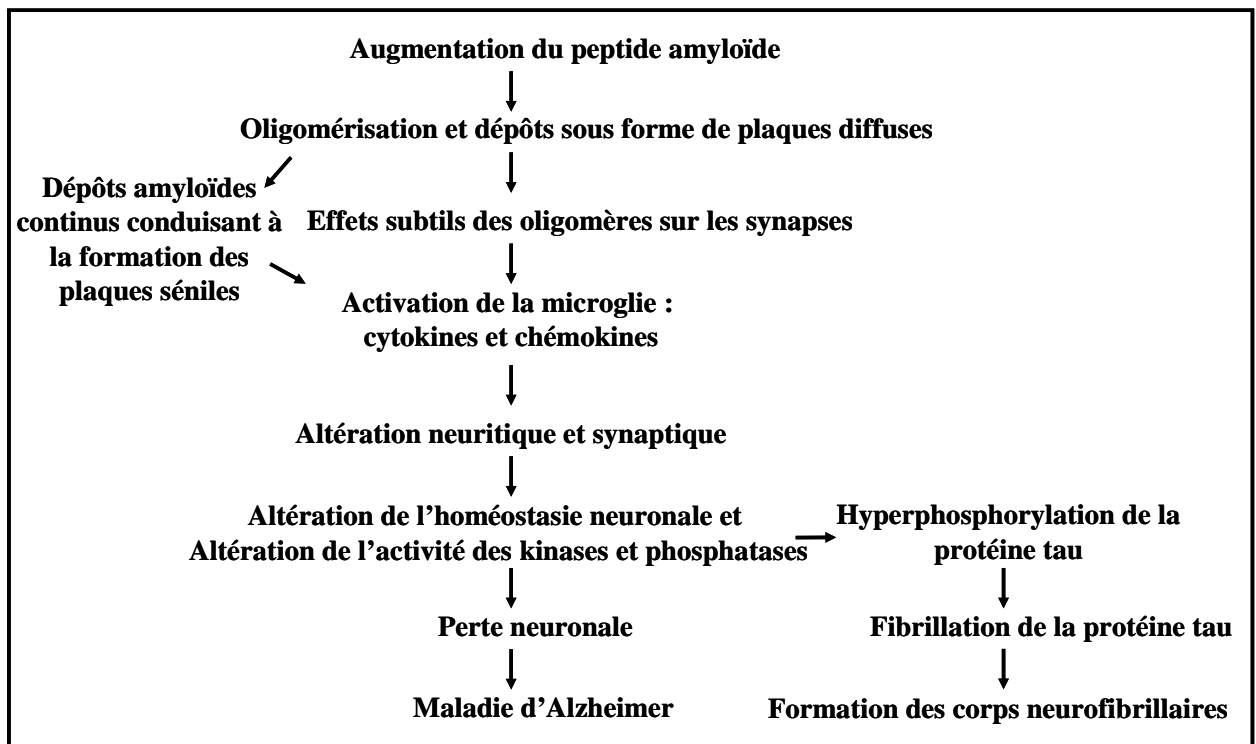


Figure 32 : Etapes de l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par J. Hardy et D. Allsop (1991). L'augmentation de la concentration du peptide amyloïde, particulièrement la forme βA_{42} , serait l'élément déclencheur causant toutes les caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer.

ii. Maladie d'Alzheimer et gyrus denté

Les interneurons du gyrus denté semblent différemment affectés par la pathologie. Celle-ci provoquerait une perte des neurones contenant des protéines de liaison au calcium, ou bien une diminution de l'expression de ces protéines : calrétinine (Kaufmann et al., 1998 ; Popovic et al., 2008 ; Takahashi et al., 2010), calbindine (Popovic et al., 2008) et parvalbumine (Brady and Mufson, 1997 ; Popovic et al., 2008). Toutefois ces pertes neuronales ne sont pas observées aux stades précoces de la maladie (Lee et al., 2004 ; Satoh et al., 1991 ; Brion and Resibois, 1994), elles n'auraient lieu que plus tardivement, à des stades déjà avancés. A l'inverse, les neurones exprimant NPY et/ou SOM sont, quant à eux, beaucoup plus sensibles et ce dès les stades précoces. Des modifications morphologiques apparaissent, accompagnées de pertes neuronales (Davies and Terry, 1981 ; Chan-Palay et al., 1986 ; Chan-Palay et al., 1987 ; Dournaud et al., 1994 ; Tomidokoro et al., 2000 ; Ramos et al., 2006). Enfin, des pertes sont également enregistrées au sein des populations neuronales exprimant la NOS1 (Norris et al., 1996 ; Yew et al., 1999).

La question de savoir si la couche granulaire enregistre des pertes neuronales dans la maladie d'Alzheimer divise les chercheurs : certains n'observent aucune perte (Korbo et al., 2004), tandis que d'autres estiment qu'elles peuvent aller jusqu'à 43% (Bobinski et al., 1996, 1997 ; West et al., 1994, 2004 ; Simic et al., 1997). Quoi qu'il en soit, il semblerait que l'expression de calbindine par ces cellules granulaires chez des sujets malades soit fortement diminuée comparée à des sujets sains (Maguire-Zeiss et al., 1995 ; Iacopino and Christakos, 1990). Dans un cadre de vieillissement non pathologique, l'augmentation intracellulaire de la concentration de calbindine pourrait être un mécanisme neuroprotecteur. Celui-ci n'étant pas mis en place dans des cerveaux malades, les cellules ne sont pas protégées de la dégénérescence (Greene et al., 2001 ; Palop et al., 2003).

Par ailleurs, la neurogénèse hippocampique au sein de la couche granulaire est perturbée, notamment la capacité des nouveaux neurones à survivre dans le cerveau malade chez l'humain

(Jin et al., 2004 ; Boekhoorn et al., 2006) et dans des modèles murins comme les souris transgéniques APP (Haughey et al., 2002 ; Donovan et al., 2006) ou APP/PS1 (Verret et al., 2007 ; Faure et al., 2011 ; Cotel et al., 2012), qui surexpriment des formes mutées de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et de la préséniline 1 humaines.

La survie à long terme des nouvelles cellules granulaires est dépendante d'une part de leur maturation morphologique, induite par le GABA et d'autre part de leur intégration fonctionnelle dans les réseaux neuronaux, et qui est induite par l'action excitatrice du glutamate (Song et al., 2005 ; Tashiro et al., 2007 ; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006 ; Markwardt et al., 2011). Des travaux récents ont proposé que la disparition prématurée des nouveaux neurones observée dans plusieurs modèles murins de la maladie d'Alzheimer puisse résulter d'un déficit de la maturation des nouveaux neurones. En particulier, ce déficit impliquerait un dysfonctionnement de la modulation GABAergique *via* les interneurons du gyrus denté (Palop et al., 2007 ; Sun et al., 2009).

5. Introduction des résultats

Ainsi les interneurones GABAergiques du hilus sont des acteurs essentiels au bon fonctionnement de la balance excitation/inhibition au sein du gyrus denté. Ils sont idéalement positionnés pour transmettre des informations en « feedback » et « feedforward » aux cellules granulaires. Le moindre dérèglement de cet équilibre peut engendrer des conséquences dramatiques.

Cependant, en partie à cause de leur grande diversité (Amaral, 1978, Freund and Buzsaki, 1996), la fonction des interneurones GABAergiques du hilus dans la physiologie du gyrus denté reste assez peu détaillée. Une meilleure connaissance des différentes populations neuronales du hilus pourrait ainsi contribuer à éclaircir leurs rôles physiologiques et leur implication dans différentes neuropathologies comme la maladie d'Alzheimer. De nombreuses classifications de ces neurones ont émergé chez le rongeur, basées sur leur comportement électrophysiologique, leur arborisation axonale et sur l'expression de marqueurs biochimiques (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al., 1998; Mott et al., 1997; revue Houser, 2007). Cependant, en grande partie à cause de limitations techniques, le nombre de critères pris en compte est restreint. De ce fait il est difficile d'établir des corrélations claires entre les différentes classes de neurones ainsi décrites (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al., 1998; Mott et al., 1997; revue Houser, 2007).

Ceci se vérifie en particulier pour les classifications électrophysiologiques, faites à partir de types neuronaux définis par leurs propriétés morphologiques (Scharfman, 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995 ; Mott et al., 1997 ; Sik et al., 1997 ; Lubke et al., 1998). Ainsi, si toutes les études s'accordent pour distinguer clairement les cellules granulaires et les cellules moussues des interneurones, la définition de classes au sein des interneurones reste plus problématique. Certaines études se sont affranchi de cette difficulté en considérant les interneurones GABAergiques du hilus comme une classe unique (Scharfman, 1992 ; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995). Mais alors que les propriétés électrophysiologiques sont homogènes au sein des groupes de cellules granulaires et de cellules moussues, elles le sont beaucoup moins

dans ce groupe d'interneurones. D'autres équipes ont donc divisé ces interneurones sur la base de critères morphologiques. Or ces critères n'étant pas forcément les mêmes, il est difficile de recouper les résultats obtenus dans ces différentes études (Mott et al., 1997 ; Sik et al., 1997 ; Lubke et al., 1998).

La technique de RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) sur cellule unique (Lambolez et al., 1992) a permis d'augmenter le nombre de descripteurs analysés par cellule. Cette technique s'est avérée un outil d'analyse très précieux, non seulement parce qu'elle permet l'étude de l'expression de nombreux ARN messagers à partir d'une seule cellule, mais surtout parce qu'elle peut être couplée à des enregistrements électrophysiologiques et à des marquages intracellulaires. Ainsi, la combinaison du patch-clamp, de la RT-PCR sur cellule unique et de l'injection d'un traceur neuronal, au niveau d'un neurone, permet d'accéder à une quantité de données considérables. Cette technique a permis d'établir des classifications d'interneurones et d'obtenir des populations plus homogènes au niveau de leurs propriétés morphologiques, électrophysiologiques et moléculaires dans l'hippocampe (Tricoire et al., 2011) ou le cortex (Cauli et al., 1997).

L'objet de ma thèse a donc été de mettre à profit cette technique afin d'obtenir une classification multiparamétrique des neurones du hilus du gyrus denté. L'approche méthodologique utilisée, les résultats et les perspectives vous seront présentés en première partie des résultats.

En deuxième partie des résultats, nous vous présenterons un projet que nous avons mené en collaboration avec Claire Rampon et Kevin Richetin (Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CRCA), visant à stimuler à l'aide d'un facteur proneural la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe de souris. Mes travaux ont consisté à caractériser le comportement électrophysiologique de ces nouveaux neurones afin de vérifier leur fonctionnalité et leur intégration au réseau hippocampique.

II RESULTATS

1. Article 1

a. Présentation de l'article 1

Comme indiqué précédemment dans l'introduction, le gyrus denté tient une place de choix dans l'hippocampe. Il constitue une des premières étapes dans le processus de traitement de l'information spatiale et l'établissement de traces mnésiques. Par ailleurs le gyrus denté est l'une des rares régions du cerveau où la production de nouveaux neurones continue de manière constitutive chez l'adulte. Les cellules progénitrices prolifèrent dans la zone sous-granulaire et suivent un processus développemental qui mène à leur intégration, en tant que cellules granulaires matures et fonctionnelles, dans le réseau neuronal préexistant (Ge et al., 2008). Ces nouveaux neurones participent à la formation et au rappel des traces mnésiques dépendantes de l'hippocampe (Trouche et al., 2009).

Les cellules granulaires, densément regroupées au sein de la couche granulaire, sont les cellules principales du gyrus denté, avec les cellules moussues excitatrices du hilus. Les interneurons GABAergiques sont éparpillés dans la couche moléculaire et présents plus densément dans le hilus. Ils sont idéalement positionnés pour transmettre des informations en feedback ou feedforward aux cellules granulaires.

Cependant, en partie à cause de leur grande diversité (Amaral, 1978, Freund and Buzsaki, 1996), la fonction des interneurons GABAergiques du hilus dans la physiologie du gyrus denté reste assez peu détaillée. Une meilleure connaissance des différentes populations neuronales du hilus pourrait ainsi contribuer à éclaircir leurs rôles. De nombreuses classifications de ces neurones ont émergé chez le rongeur, basées sur leur comportement électrophysiologique, leur arborisation axonale et sur l'expression de marqueurs biochimiques (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al.,

1998; Mott et al., 1997; revue Houser, 2007). Toutefois il reste difficile d'établir des liens entre ces classifications en raison de la diversité des critères utilisés (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al., 1998; Mott et al., 1997; revue Houser, 2007).

En vue de mieux définir les sous-populations d'interneurones du hilus, nous avons tout d'abord étudié la localisation et la répartition dans le hilus des interneurones GABAergiques par rapport aux neurones glutamatergiques. A l'aide de souris transgéniques adultes exprimant la GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur de la GAD67 (glutamic acid decarboxylase 67k), nous avons déterminé les densités de cellules exprimant la GFP parmi celles qui étaient marquées pour NeuN (neuronal nuclei antigen) En outre d'autres immunomarquages ont permis de mesurer l'expression dans le hilus et la couche granulaire de marqueurs neurochimiques tels que la calrétinine, la parvalbumine, la somatostatine, le neuropeptide Y, l'oxyde nitrique synthétase 1, et le peptide vasoactif intestinal.

Pour compléter cette caractérisation des types neuronaux dans le hilus chez la souris adulte, nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques de chaque neurone. Pour ce faire, l'approche mise en œuvre a été le patch-clamp sur cellule entière, sur des tranches d'hippocampe de souris C57Bl6 âgées de deux à trois mois, suivi par des injections de biocytine, puis par des scRT-PCR (single-cell reverse transcriptase polymerase chain reaction) pour tester l'expression des marqueurs précédemment étudiés en immunomarquages.

Une analyse non supervisée en clusters, prenant en considération les paramètres électrophysiologiques et moléculaires déterminés pour chaque neurone, nous a permis d'identifier un cluster de cellules excitatrices et trois clusters d'interneurones GABAergiques.

En clarifiant la diversité des neurones du hilus du gyrus denté chez la souris adulte, cette étude constitue une base solide pour de futurs travaux cherchant à comprendre leurs rôles physiologiques par exemple dans la maturation et la survie des cellules granulaires nouvellement

générees, ainsi que leur possible implication dans des neuropathologies comme la maladie d'Alzheimer ou l'épilepsie.

b. **Article 1 : Multiparametric characterization of GABAergic and glutamatergic neurons of the hilar dentate gyrus in mice**

Multiparametric characterization of GABAergic and glutamatergic neurons of the hilar dentate gyrus in mice

Authors : Leclerc C. (1, 2, 3), Vitalis T. (1), Geoffroy H. (1), Richetin K. (2, 3), Perrenoud. Q (1), Rampon C. (2, 3), and Gallopin T. (1)

(1) Laboratoire de Neurobiologie, ESPCI ParisTech, UMR 7637, Paris

(2) Université de Toulouse; UPS; Centre de Recherches sur la Cognition Animale; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 4, France

(3) CNRS; Centre de Recherches sur la Cognition Animale; F-31062 Toulouse, France

Running title : Hilar dentate gyrus neurons

43 pages

6 figures, 5 tables

Corresponding author: Thierry Gallopin, CNRS UMR 7637, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin 75005 Paris. thierry.gallopin@espci.fr

Keywords: classification, hippocampus, interneurons, NPY, SOM

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the France Alzheimer Association; the Centre National de la Recherche Scientifique and University of Toulouse.

Abstract

In the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, hilar excitatory mossy cells and GABAergic interneurons convey feedback or feedforward signals to granule cells and thus constitute key components of the network. However because of their large diversity, the function of hilar GABAergic neurons in the physiology of the DG remains poorly understood. Using transgenic mice expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the glutamic acid decarboxylase 67k promoter, we investigated the densities of GABAergic cells immunolabelled against Calretinin (CR), Parvalbumin (PV), Somatostatin (SOM), Neuropeptide Y (NPY) and Nitric Oxide Synthase 1 (NOS-1) throughout the hilus and granular layer showing that each marker accumulate in preferential areas of the DG. To further define distinct populations of DG interneurons, we characterized 123 hilar neurons using whole-cell patch-clamp recordings followed by single-cell RT-PCR in acute slices of young adult C57Bl6 mice. Unsupervised clustering based on 18 electrophysiological and 7 molecular parameters clearly distinguished one excitatory mossy cells (n=67) from three clusters of GABAergic interneurons (n=56). The two first clusters both comprised neurons (n=18 and n=16) co-expressing NPY and SOM but clearly differed by their electrophysiological properties. The third cluster of interneurons contained fast spiking cells expressing PV (n=9) and neurons expressing NOS-1 (n=13).

This multiparametric study supports the existence of distinct functional classes of inhibitory neurons in the DG.

Introduction

Being the first stage of the excitatory trisynaptic loop, the dentate gyrus (DG) plays a strategic role in the hippocampal formation and contributes to the creation of episodic memories by processing and representing spatial information based on conjunctive encoding of multiple sensory inputs and pattern separation (Scoville and Milner, 1957; Hargreaves et al., 2005; Gilbert et al., 2001). Indeed, DG is the primary target of the majority of entorhinal afferents via the perforant path (Ramon y Cajal, 1893; Blackstad, 1958; Nafstad et al., 1967) that terminate in a laminar fashion on granule cell dendrites and conveys sensory information of multiple modalities.

Moreover, the DG is one of the few regions where the production of new neurons still occurs in the mammalian adult brain in a constitutive way (Altman and Das, 1965). Progenitors proliferate in the subgranular zone and follow a developmental process leading to their integration into the preexisting neuronal network as mature and functional granule cells (Ge et al., 2008). These adult-born neurons participate to the formation and retrieval of hippocampal-dependent forms of memories (Trouche et al., 2009). The functional role of DG depends on specific neuronal circuits.

Granule cells are the principal components of the DG network and are densely packed to form the granule cell layer. The excitability of granule cells is modulated by hilar DG neurons comprising glutamatergic mossy cells and GABAergic interneurons (Amaral et al., 2007). Hilar GABAergic interneurons constitute critical components of the dentate circuitry. They are interconnected with mossy cells (Larimer et al 2008) and are ideally positioned to convey feedback or feedforward signals to granule cells (Scharfman et al., 1992; Scharfman, 1995). Because of their large diversity (Amaral, 1978, Freund and Buzsaki, 1996), the function of hilar GABAergic interneurons in the physiology of the DG is still poorly understood. Furthermore, neurons of the hilar region is one of the most vulnerable brain regions to various

pathophysiological conditions, including epilepsy, brain trauma, and ischemia (Dam, 1980; Sloviter, 1989; Schmidt-Kastner and Freund, 1991; Lowenstein et al., 1992; Magloczky and Freund, 1993). A better knowledge of these neurons is thus a prerequisite to deciphering their role in DG circuitry. Numerous classifications of rodent hilar interneurons have emerged based on their firing behavior, axonal arborization and neurochemical content (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al., 1998; Mott et al., 1997; Houser, 2007). However, no clear consensus on their classification has emerged so far.

In this study, we characterized the distribution and the diversity of the hilar DG neurons. First of all, we have compared the proportion and the location in the DG of GABAergic interneurons with those of glutamatergic neurons by using NeuN immunolabelling on transgenic mice expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the glutamic acid decarboxylase 67k (GAD67) promoter (Tamamaki et al., 2003). Secondly, we have analyzed the distribution of GABAergic interneurons immunoreactive for Calretinin (CR), Parvalbumin (PV), Somatostatin (SOM), Neuropeptide Y (NPY), Nitric Oxide Synthase 1 (NOS-1) and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) throughout the hilus and granule cell layer. Finally, in order to rigorously define hilar neuronal types in the adult mice, we characterized the physiological and molecular properties of 123 hilar neurons using whole-cell patch-clamp recordings, biocytin injections and single-cell reverse transcriptase (scRT)-PCR probing neurochemical markers previously by immunohistochemistry in hilar GABAergic interneurons in acute slices of two to three months-old C57Bl6 mice. Unsupervised clustering was performed, on the basis of electrophysiological and molecular features determined for each individual neuron. This approach allowed the identification of one cluster of excitatory cells and three main clusters of GABAergic interneurons.

Materials and Methods

Immunohistochemistry: Eight P50 GAD67-GFP Knock-In (Δ neo) transgenic mice (Tamamaki et al., 2003) maintained on a C57BL/6 genetic background were used for this study. Mice were kindly provided by Dr Y. Yanagawa. Mice were deeply anaesthetized with an intraperitoneal (IP) injection of Pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0,1M saline phosphate buffer (PBS), pH 7.4 (PFA). Brains were dissected out, embedded in 3% agarose diluted in PBS and cut coronally on a vibratome (Leica; VT1000S). Free-floating 45 μ m thick coronal sections were collected serially. Alternate sections were incubated for 48 hours at 4°C with one of the following antibodies diluted in PBS containing triton (0.2%; PBST): anti-NeuN(1:1000, Tamecula), rabbit anti-PV (1:800; Swant PV28), rat anti-SOM (1:500; Millipore MAB354), rabbit anti-NPY (1:8000, Sigma N9528), rabbit anti-VIP (1:500, ImmunoStar 20077), or rabbit anti-NOS1 antibody (1:500; Santa-Cruz sc-648). After washing in PBST, sections were incubated with AlexaFluor 568 goat anti-rabbit antibody or AlexaFluor 568 goat anti-rat antibody (1:300; Invitrogen). Sections were rinsed in PBST, mounted in Vectashield (Vector) containing Dapi.

Counting of GABAergic immunostained neurons: Immunostained slices of GAD67-GFP knock-in (Δ neo) transgenic mice were observed with a fluorescent microscope (Zeiss, Axio Imager M1) equipped with an AxioCam MRm CCD camera (Zeiss). For each mouse and each marker, a ventral slice, a median slice and a caudal slice were selected. For these selected slices mosaics were constructed from images spanning the hilus and granular cell layer of the dentate gyrus, acquired using a 10X objective, with the AxioVision 4.7 software (Zeiss) and stored as gray scale bitmaps. Counts were performed using a homemade procedure written in IGOR PRO 6 (WaveMetrics) adapted from Perrenoud et al., 2012. In order to detect variation of cell density depending on the position within the granular cell layer or the hilus, the granular cell layer outer and inner blades and the hilar outer and inner halves were divided into 8 bins following their shapes using a

homemade algorithm. Briefly, for each of the 4 regions (granular cell layer outer and inner blades and of hilar outer and inner halves) two contours were drawn as successions of segments. Along each of these contours 31 points were positioned at regular intervals. After having selected one of the four regions a set of 31 lines was applied to the picture, each of these lines intercepting the corresponding points of the two contours (first point of contour 1 with first point of contour 2 and so on). The segments enclosed within the two intercepts were divided into height equal subsegments and the extremities of corresponding subsegments were joined so as to construct a grid of quadrilaterals. Adjacent quadrilaterals were joined along the contours axis so as to construct 8 bins of the region following its shape. The area of each bin was computed as the sum of its composing quadrilaterals and was expressed in square millimetres. Reference scaling was estimated using scalebars provided by AxioVison 4.7 and was verified with a graticule. For each animal and each coronal position, final values of densities were computed, normalizing the sum of counted cells by the corresponding counted area.

Slice preparation for electrophysiological recordings: All experiments were performed in accordance with the guidelines of the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). C57BL/6 mice (Charles River) aged 2 to 3 months were deeply anesthetized with ketamine (1%) and xylazine (1‰) and were perfused intracardially with an ice-cold sucrose solution containing (in mM): CaCl₂ (1), glucose (10), KCl (1), MgCl₂ (5), NaHCO₃ (26), sucrose (248). Mice were decapitated and brains were removed in the same ice-cold solution. Horizontal slices, 300 µm thick, were cut with a vibratome (VT-1200, Leica) and then put for 10 minutes in a chamber containing artificial CerebroSpinal Fluid (aCSF) warmed to 33°C containing (in mM): CaCl₂ (2), KCl (2,5), MgCl₂ (3), NaH₂PO₄ (1), NaCl (124), glucose (11); NaHCO₃ (26,2). Slices were then kept at room temperature until use. In each of these steps the slices were continuously aerated with Carbogen (95%O₂/5%CO₂) (Air Liquide).

Whole cell Patch-Clamp recordings: Slices were submerged in a recording chamber, placed on the stage of an Axioskop 2FS microscope (Carl Zeiss), equipped with Dodt gradient contrast optics (Luigs & Neuman), and a CoolSnap FX CCD camera (Roper scientific) and visualized by using infra red (IR) videomicroscopy. The preparation was continuously superfused (1-2 ml/min) with oxygenated aCSF. Pipettes (2 to 6 M Ω) were pulled from borosilicate capillaries and filled with 8 μ l of autoclaved internal solution containing 144 mM K-gluconate, 3 M MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm), and 3 mg/mL biocytin (Sigma). Whole cell recordings were performed at room temperature in the current Clamp mode of a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices). Signals were filtered at 4 kHz and digitized at 50 kHz by using an analogue signal converter (Digidata 1322A, Molecular Devices), connected to a computer running pClamp 10.2 (Molecular Devices). Junction potentials were not corrected.

Single cell RT-PCR protocol: At the end of recordings, cytoplasm was gently aspirated into the patch pipette. Pipettes were slowly removed from recorded cells in order to allow closure of the membrane. The content of pipettes was expelled into a test tube in which reverse transcription was performed as described previously (Lambolez et al., 1992). Products of reverse transcription were stored at -80°C until further processing was performed. The single cell RT-PCR protocol was designed to detect the presence of messenger RNAs coding for the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), the two isoforms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67), the neuronal nitric oxide synthase (NOS-1), the calcium binding proteins calretinin (CR) and parvalbumin (PV), and the neuropeptides somatostatin (SOM) and neuropeptide Y (NPY) (table 1). Two successive rounds of amplification were performed using nested primer pairs (Cauli et al., 1997). All markers were first amplified simultaneously with a first set of primers (table 1), undergoing 21 cycles of amplification (94°C for 30s, 60°C for 30s and 72°C, 35s) in a final volume of 100 μ l. Each marker was then amplified individually using a second primer pair internal to the pair used in the first round (nested primer pairs) during 35 additional cycles of amplification. All

primers (table1) were designed to be on two different exons of the target messenger RNA so as to differentiate actual transcripts from eventual genomic DNA contaminations. The presence of products of amplification was finally detected on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma). The size of the products was systematically verified by comparison to the migration of a standard molecular weight marker (100 bp Ladder, Promega).

Histochemical labelling of recorded neurons: Recorded slices were fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate Buffer (PB) pH7.4. Slices were then kept in PB at 4°C until further processing was performed.

Some of the slices were then sequentially incubated in PB containing 1% H₂O₂ in order to quench endogenous peroxidase, and in PB containing Avidin Biotin Complex (Vector; 1:200) and Triton X-100 (0.5%). The arborization of the neurons was revealed with a solution of diaminobenzidine nickel (DAB elite kit, Vector). Between each step slices were thoroughly rinsed in PB. Slices were finally mounted in Mowiol (Calbiochem).

The other slices were incubated overnight at 4°C in PB containing streptavidin, Alexa 488 conjugate (1:200; Invitrogen) and Triton X-100 (0.3%). Then they were incubated 20 min in PB containing propidium iodide (1:200, Invitrogen). Between each of these steps slices were thoroughly rinsed in PB. Slices were finally mounted in Vectashield (Abcys). When the morphology of the recorded cells was clearly visible with sufficient detail, images of these cells were acquired using a Nikon confocal system.

Image acquisition and morphological analysis: Images of Alexa 488 stained neurons were acquired at 0.2-0.5 μ m intervals with Nikon confocal system with a plane apochromatic 20x air or 60x oil lens (numerical aperture 0.75-1.4; Nikon) and a digital zoom of 5. Image files were subjected to five iterations of deconvolution with AutoDeblur (AutoQuant). Confocal Z-section images were analyzed in maximal projection using ImageJ or in three dimensions with Imaris

software. According to the interneurons nomenclature described by Ascoli et al (2008), somatic shape, localization, size and orientation, dendritic arborization and polarity, dendritic beads and spines density, axon origin and target were characterized.

Electrophysiological analysis: In order to describe the behavior of recorded neurons comprehensively, 26 electrophysiological parameters were measured on traces corresponding to the voltage responses induced by 800ms hyperpolarizing and depolarizing current pulses. These parameters are following the Petilla nomenclature (Ascoli et al., 2008). (1) Resting Potential (RMP) was measured immediately after electrical access to the intracellular compartment of the cell was achieved. (2) Input resistance (R_m), (3) Membrane time constant (τ_m) and (4) Membrane capacitance (C_m) were determined in response to an hyperpolarizing current pulse eliciting a maximal voltage response of -10 to -15 mV (Kawaguchi, 1993). R_m was measured following Ohms law and τ_m was computed as the time constant of a single exponential fit of the voltage response from onset to maximum hyperpolarization. C_m was obtained following the formula $C_m = \tau_m / R_m$. Some neurons have been described to undergo a partial repolarization following a hyperpolarization peak in response to negative currents, reflecting the activation of the voltage activated cationic current (I_h). In order to quantify this phenomenon, the maximal resistance R_{hyp} (5) was computed as the slope of a linear curve fitted to the current-voltage (IV) plot of the maximal voltage response of recorded neurons to hyperpolarizing current injections ranging from -100 pA to 0 pA with a 10 mV increment. Similarly the steady state resistance R_{sag} (6) was estimated as the slope of a linear curve fitted to the IV plot of the steady state voltage response to hyperpolarizing currents measured at the end of 800 ms pulses (Karagiannis et al., 2009). (5) Sag Ratio (7) was computed to correspond to R_{sag} expressed as a percentage of R_{hyp} . (8) Rheobase was computed as the minimal current necessary to induce an action potential. As some neurons have been shown to display a delayed firing (Ascoli et al., 2008), (9) First Spike Latency was computed as the time needed to elicit a spike after the onset of a current pulse

corresponding to the rheobase. In order to describe the variety of firing behaviours around threshold with quantitative parameters, the interspike intervals measured in response to the minimal current injection eliciting more than three action potentials were plotted and fitted to a linear curve. (10) Adaptation ($m_{\text{threshold}}$) was computed as the slope of the linear fit and (11) Minimal Steady State Frequency (F_{min}) was computed as its y-intercept ($F_{\text{threshold}} = m_{\text{threshold}} * t + F_{\text{min}}$). At high firing frequencies, adaptation has been described to adopt a complex kinetic characterized by an early exponential decrease in spike frequency, followed by a subsequent linear decrease. In order to fully quantify this behavior, the inter-spike interval of the train of spikes induced by the maximal depolarizing current injection that did not induce saturation, was fitted to the addition of a decaying single exponential and of a linear function (Halabisky et al., 2006). (12) Amplitude of late adaptation (A_{sat}), (13) Time constant of late adaptation (τ_{sat}), (14) Maximal steady state frequency (m_{sat}) and (15) Late adaptation (F_{max}) were defined such that $F_{\text{sat}} = A_{\text{sat}} * \exp(-t / \tau_{\text{sat}}) + m_{\text{sat}} * t + F_{\text{max}}$. Mean instant frequency (16) was measured for this train of spikes induced by the maximal depolarizing current injection that did not induce saturation. Spike waveforms have been described to vary between neuronal cell types (Cauli et al., 2000). In order to quantify these variations six parameters have been measured on the first and second spikes on the trace corresponding to the minimal depolarizing current injection eliciting at least three action potentials. (17), (21) The amplitudes of the first (A1) and second action potential (A2) were defined as the difference of membrane potential between its onset and its peak. (18), (22) Spike durations of the first (D1) and second spike (D2) were defined as the spike width at half amplitude. After Hyperpolarization Potentials (AHP) are complex phenomenons that require the intervention of several cationic currents with different kinetics (Sah & Faber 2002). The amplitude and kinetics of these currents can vary significantly between cell types resulting in differences in AHP waveforms (Cauli et al., 2000; Halabisky et al., 2006). (19), (23) AHP maxima (AHP1_m, AHP2_m) were calculated using the membrane potential at the onset of the action

potential as a reference. Comparatively (20), (24) AHP latencies (t_{AHP1m} , t_{AHP2m}) were calculated as the time span between the AHP maximum and the onset of the action potential (Vucurovic et al., 2010). During a spikes train, spikes can display variations in their amplitudes and durations at half width. In order to quantify this phenomenon, (25) Amplitude reduction (Amp.Red) and (26) Duration increase (Dur.Inc) were computed as $(A1-A2)/A1$ and $(D2-D1)/D1$ respectively (Cauli et al., 2000).

Unsupervised clustering and statistical analysis: Clusters were generated with Ward's method and then corrected using the K-means algorithm as described in Perrenoud et al., 2012. Parameters used for clustering were RMP, R_m , τ_m , C_m , R_{hyp} , Sag Ratio, Rheobase, First spike latency, A_{sat} , t_{sat} , C_{sat} , m_{sat} , A1, D1, AHP1_m, t_{AHP1m} , Amp.Red, Dur.Inc, VGlut1, GAD, NOS1, PV, CR, NPY and SOM. Molecular parameters were computed as binary variables set to 1 if the marker was present and 0 if it was absent. GAD corresponds to the expression of GAD65 or GAD67. For all parameters, distributions were centered and reduced prior to clustering. The quality of clusterings was assessed by comparison to clusterings generated with a similar approach on randomized databases (Karagiannis et al., 2009). In order to perform randomization, vectors representing variables in the data matrix were replaced by independent random permutations. This scrambling did not alter the distribution of parameters but disrupted the correlation between them. The clustering qualities were compared using silhouette analysis. In this method the value $S(i)$ is computed for each data point as: $S(i) = (b(i) - a(i)) / \max[a(i), b(i)]$ where, for a data point i , $a(i)$ corresponds to the average distance between i and the points belonging to the same cluster and $b(i)$ corresponds to the average distance between i and the points of the closest cluster. In our case a positive silhouette value indicates that on average the neuron is closer to the neurons of its own cluster than from the neurons belonging to other clusters, in the parameters space. By contrast a negative value indicates a potential misclassification. Thus a decrease of the mean silhouette value of the cells following randomization was interpreted as a

lower quality of clustering. Ward's clustering was performed on the Statistica software (Statsoft). K-means clustering, principal component analysis and silhouette analysis were performed within the Matlab environment (MathWorks).

Statistical analysis: The subdivision of interneurons proposed here corresponds to a polythetic classification scheme that intrinsically tolerates a certain degree of variability within classes (Karagiannis et al., 2009). For electrophysiological variables, differences between pairs of identified clusters were systematically tested using nonparametric Mann-Whitney U-tests. In order to test differences in the occurrence of molecular markers between clusters, we computed the statistic $|z| = |p_a - p_b| / \sqrt{(pq/n_a) + (pq/n_b)}$ where p_a and p_b represent the percentage of occurrence of the marker, and n_a and n_b the number of individual in clusters a and b. The percentages of occurrence and of absence of the marker in the overall population were represented by p and $q=1-p$ respectively. P-values of the difference of expression were computed by plotting this statistic against a standard normal distribution (Karagiannis et al., 2009). Mann-Whitney U-tests were performed within the Matlab environment (MathWorks).

Mapping of the recorded neurons within the hilus: The recorded neurons were sorted out according to their horizontal position: ventral, median or dorsal. For these three positions a schematic representation of the hilus was drawn. Each slice was observed with a DMR microscope (Leica), equipped with a standard NeuroLucida system (MBF Bioscience). The schematic representation corresponding to the slice horizontal position was superimposed on the direct visualization of the hilus and the position of the recorded neuron was marked with a point and its coordinates. With this method coordinates were assigned to each cell either in the ventral, median or dorsal space.

Results

GAD expression in hilar and granular cell layer neurons

Visualization of the whole population of GABAergic interneurons in the dentate gyrus has proven to be really challenging. Indeed, studies relying either on immunolabelling of GABA or Glutamate Acid Decarboxylase (GAD) are prone to underdetection and have led to not always converging conclusions (Ribak et al., 1978; Sloviter and Nilaver, 1987; Babb et al., 1988; Woodson et al., 1989; Jinno et al., 1998). In order to get round this difficulty, we used P50 GAD-67 GFP knock-in transgenic mice (Tamamaki et al., 2003) where GFP has been shown to be restricted to, and expressed in all hippocampal GABAergic neurons. Thus, using immunolabelling of the neuronal nuclear antigen NeuN on this mouse strain, we could visualize the repartition of GABAergic neurons among the whole neuronal population. To get quantitative measures of the distribution of GABAergic neurons, we delineated four regions: granular cell layer inner (figure 1A4) and outer (figure 1A1) blades and hilar inner (figure 1A3) and outer (figure 1A2) halves. Each of these regions was divided in 8 bins (fig 1A5, see Materials & Methods). Labeled cells were counted in each bin and counts of GFP positive cells were normalized by bin areas so as to provide measures of density (cells/mm², figure 1B-E). Counting of NeuN expressing cells was restricted to the hilus as densities were too high in the granular cell layer and individual cells could not be distinguished. To detect potential variations in cell density between hippocampal regions, counts were repeated at three distinct position along the antero-posterior axis: rostral, median and caudal (see Materials and Methods). Whatever the coronal position, the overall neuronal population was evenly distributed throughout the hilus. In contrast GABAergic neurons were preferentially located near the subgranular layer, rather than in the deep hilus or the outer part of the granular cell layer (figure 1B-E). In the hilus we found that GABAergic cells represented 40% of NeuN expressing cells, and this proportion was not dependent on the coronal position (figure 1F).

Distribution of CR in hilar neurons

In the hilus the calcium binding protein CR has been shown to be expressed mainly in glutamatergic mossy cells (Liu et al., 1996; Blasco-Ibanez and Freund, 1997; Fujise et al., 1998; Houser, 2007), which represent a vast majority of non GABAergic hilar neurons, and seldom in GABAergic neurons (Gulyas et al., 1996). To verify this hypothesis, we performed immunolabelling of CR on GAD67-GFP mouse. Granular cell layer was excluded from the counting of CR expressing cells because CR is transiently expressed in newborn granule cells located in the subgranular layer (Brandt et al., 2003). In the hilus the colocalization of CR with GABA was really sparse as less than 5% of GABAergic neurons were labeled by CR (figure 2A4). On the contrary CR non GABAergic neurons, presumably mossy cells, were densely distributed throughout the entire hilus confirming that CR is mainly expressed in excitatory cells in the DG. The densities of CR labelled cells reached levels comparable to that of GABAergic neurons in median and caudal hilus, except for the subgranular zone where they were poorly represented. In rostral hilus CR neurons densities were lower compared to median and caudal hilus.

Distribution of PV, SOM, NOS1, NPY and VIP in GABAergic hilar and granular cell layer neurons

In order to characterize the diversity of the GABAergic neuronal population we studied the patterns of expression of classical interneurons markers such as the calcium binding protein PV, the neuropeptides SOM, NPY and VIP, and the neuronal nitric oxide synthase NOS-1. Each marker displayed a specific distribution in the DG.

GABAergic neurons labeled for PV were found in all bins of depth of granular layer and hilus. Yet they were clearly much more concentrated near the granular cell layer-hilus border as 61% of them were found in bins 6-9 and 22-25 (figure 2B4). Whatever the coronal position PV neurons represented a higher proportion of GABAergic neurons in the granular layer (43% in total) than in the hilus (22% in total), but both these proportions decreased when moving caudally.

SOM neurons were dispatched throughout the hilus, with densities increasing when moving away from the granular cell layer and reaching their peaks in deep hilus in central bins of depth (12-16) (figure 2C4). 80% of SOM hilar neurons were located in the deep hilus (bins 10-21). Globally they accounted for 27% of GABAergic neurons in the hilus and 8% in granular layer.

NOS-1 neurons were distributed in the whole hilus and granular cell layer. They shared the same scheme of distribution as the overall GABAergic population with lower values of density: sparse distribution in the granular cell layer, peak of density at the subgranular zone (bins 7-9 and 22-24) (figure 3A4). Globally 35% of GABAergic neurons were positive for NOS-1 in the hilus and 31% in the granular cell layer. These proportions fell to 28% and 21% respectively in caudal hippocampus.

NPY was the most expressed marker in hilar GABAergic neurons: 60% of hilar GABAergic neurons were labeled for NPY (figure 3B4). In contrast, densities of NPY neurons remained weak in granular cell layer and only 31% of GABAergic neurons expressed NPY in the granular cell layer. Distribution of NPY neurons was quite homogeneous within the hilus, with a slight increase of their density at the GCL outer blade-hilus border (bins 7-9).

Finally, VIP was practically not expressed in GCL and hilus: they accounted for less than 4% of GABAergic cells (data not shown).

Identification of classes among hilar neurons

In order to further characterize the neuronal populations of the hilus, we performed patch-clamp recordings combined with scRT-PCR on 123 hilar neurons. Twenty-six electrophysiological parameters were measured on these neurons in accordance with the Petilla nomenclature (Ascoli et al., 2008; Karagiannis et al., 2009; Perrenoud et al., 2012). These included passive membrane properties (table 2), properties of discharge at threshold (table 3) and saturation (table 4), and action potentials properties (table 5). The scRT-PCR protocol was designed to detect the

expression of 8 classical interneuron molecular markers (see Materials & Methods): Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1), Glutamic Acid Decarboxylase 65K and 67K (GAD65 and GAD67), CR, PV, SOM, NOS-1 and NPY. We chose not to include VIP as its expression has proved to be really rare in the hilus and granule cell layer. To bring together cells with close electrophysiological and molecular properties, we performed Ward's unsupervised clustering analysis (Tamas et al., 1997; Cauli et al., 2000; Karube et al., 2004; Vucurovic et al., 2010; Halabisky et al., 2006; David et al., 2007; Dumitriu et al., 2007; Helmstaedter et al., 2009). To avoid redundancies between parameters we selected 18 electrophysiological and 7 molecular parameters. The analysis segregated two main clusters: one composed of glutamatergic neurons expressing the vesicular glutamate transporter VGLUT1 and one composed of GABAergic neurons expressing at least one of the two isoforms of GAD (figure 4A). Interestingly, GABAergic neurons further subdivided in 3 classes: class 1, class 2 and class 3. Class 1 and class 2 were similar by their molecular characteristics (NPY and SOM), though very distinguishable regarding electrophysiological properties (figure 5). Class 3 contained neurons expressing either PV or NOS-1.

To correct for potential misassigned cells after Ward's iterative process we used K-means algorithm initialized on Ward's clusters centroids (Perrenoud et al., 2012). Eleven cells appeared to be misclassified and were attributed to another cluster (figure 4D). The relevancy of this clustering was assessed by performing a silhouette value analysis (see Materials and Methods, figure 4B). We obtained a mean silhouette value of 0.3959 which was an indication of high clustering quality. In agreement positive values of silhouette were observed for practically all the neurons which confirmed that they were correctly assigned to their clusters. We then used principal component analysis to get a representation of neurons dispersion in the parameters space (figure 4C). The two dimensional projection of the 123 recorded neurons along the first and

second order components of the PCA highlighted the strong segregation between glutamatergic and GABAergic neurons.

Characterization of hilar glutamatergic neurons

Sixty-seven glutamatergic neurons emerged clearly from the cluster analysis. We found that cells from this cluster were significantly different from other neurons regarding their high expression of mRNA for VGlut1 (100%) and CR (72%), and their weak expression of GAD mRNA (6%) (figure 5B1 and table 2). At the electrophysiological level, these glutamatergic cells differed from other neurons by their high membrane time constant and capacitance, strong inward rectification of membrane resistance in response to hyperpolarizing current pulses (table 3 and figure 5A1) and long firing latency rheobase (table 4). They also displayed adapting firing rates at saturation, and had low maximal frequencies of discharge (table 5); their first and second spikes near threshold had very high amplitude and duration, and were followed by small AHPs (table 6). Morphologically, neurons from this cluster had a polygonal soma and a multipolar dendritic tree (n=11). The vast majority of their spiny dendrites was confined to the hilus and thorny excrescences were present on cells bodies and proximal dendritic shafts (figure 5C1).

Characterization of hilar GABAergic interneurons

Class 1 neurons systematically expressed the mRNA for GAD (100%, n=18) and were characterized by the prominent expression of NPY (89%) and SOM (72%) mRNAs (figure 6b and table 2). These markers appear to be frequently co-expressed in hilar GABAergic neurons (Kohler et al., 1987; Deller and Leranth, 1990; Chan-Palay, 1987; Kosaka et al., 1988). Electrophysiologically class 1 adapting NPY/SOM neurons had a depolarized resting membrane potential (table 3) and were recognizable above all by their action potentials features. Indeed they emitted fast high amplitude first spikes near threshold, followed by pronounced adaptations in their amplitude and duration (figure 5A2 and table 6). At the morphological level, class 1

neurons had a round soma (80%, n=5) located in the deep hilus. Their multipolar dendritic arborization was restricted to the hilar region and exhibited no or very few spines (figure 5C2).

Class 2 neurons were quite similar to class 1 neurons by their molecular properties: 100% expressed the mRNA for GAD (n=16), 69% for NPY and 63% for SOM (figure 5B3 and table 2). Yet they disclosed clearly distinguishable electrophysiological features from class 1 neurons. Their most noticeable characteristics were their passive membrane properties such as their very high membrane resistance and high membrane time constant (figure 5A3 and table 3). Moreover they had the ability to fire at very low levels of injected currents as shown by their low rheobase (table 4). Class 2 neurons had a fusiform soma (75%, n=4), located around the subgranular zone (figure 5C3). Their dendritic tree was typically bitufted, sparsely spiny and extended its branches in all layers of the dentate gyrus. For two neurons the axon was visible in the molecular layer.

Two distinct subpopulations of neurons emerged among the twenty-two GABAergic neurons of class 3 (table 2), owing to their molecular properties. The first one, named 3.1, comprised 9 neurons characterized by PV mRNA expression (100%, figure 8b1) and no or very weak expression of NOS-1, CR, NPY and SOM. The second one, 3.2, was composed of 13 neurons transcribing NOS-1 (77%) and NPY (46%, figure 5B4) but not PV, CR or SOM. At the electrophysiological level, these two subpopulations shared quite similar properties. Their most typical one was the capacity to fire high frequency spikes trains at saturation (figure 5A4, table 5). In addition they had a more hyperpolarized resting membrane potential compared to other neurons, low input resistance and membrane time constant, and very light, if any, rectification of membrane resistance in response to hyperpolarizing current pulses (table 3). They had a very high rheobase, a high first spike latency (table 4) and often displayed a stuttering pattern of firing near threshold. Moreover they displayed small amplitude and fast action potentials, as well as fast AHPs. A striking feature was their complete lack of spike amplitude and duration adaptation (table 6). 3.1 and 3.2 classes shared some electrophysiological properties, nonetheless some

differences could be noticed. 3.1 neurons had much higher frequencies of discharge, smaller input resistance and membrane time constant, higher rheobase, shorter spike duration, longer AHPs than 3.2 neurons.

At the morphological level, neurons from subclasses 3.1 (n=3) and 3.2 (n=3) were quite similar. The shape of their soma could be pyramidal (50%), round (17%) or fusiform (33%), and it was always located along the base of the granule cell layer (figure 5C4). Their multiple dendrites were sparsely spiny and ramified extensively within the hilus and often crossed the granule cell layer extending for long distances in the molecular layer. The axonal arbor was visible for two neurons in the inner molecular layer and in the granule cell layer.

Distribution of the recorded neurons along the dorsoventral extend of the hilus

In order to get an overview of the localization of the recorded neurons along the dorsoventral axis and within the hilus, their positions were mapped (see Materials & Methods, figure 6). Recorded hilar neurons were situated in the whole dorsoventral extend of the DG and both in the outer and inner halves of the hilus (figure 6A, 6B and 6C). Mossy cells and classes 1 and 2 neurons were scattered throughout the hilus whereas class 3 neurons were generally aggregated in the subgranular zone. Given hilus geometry, all neurons from the dorsal part were quite close to the granule cell layer as dorsal slices were cut just under the closing of granule cell layer.

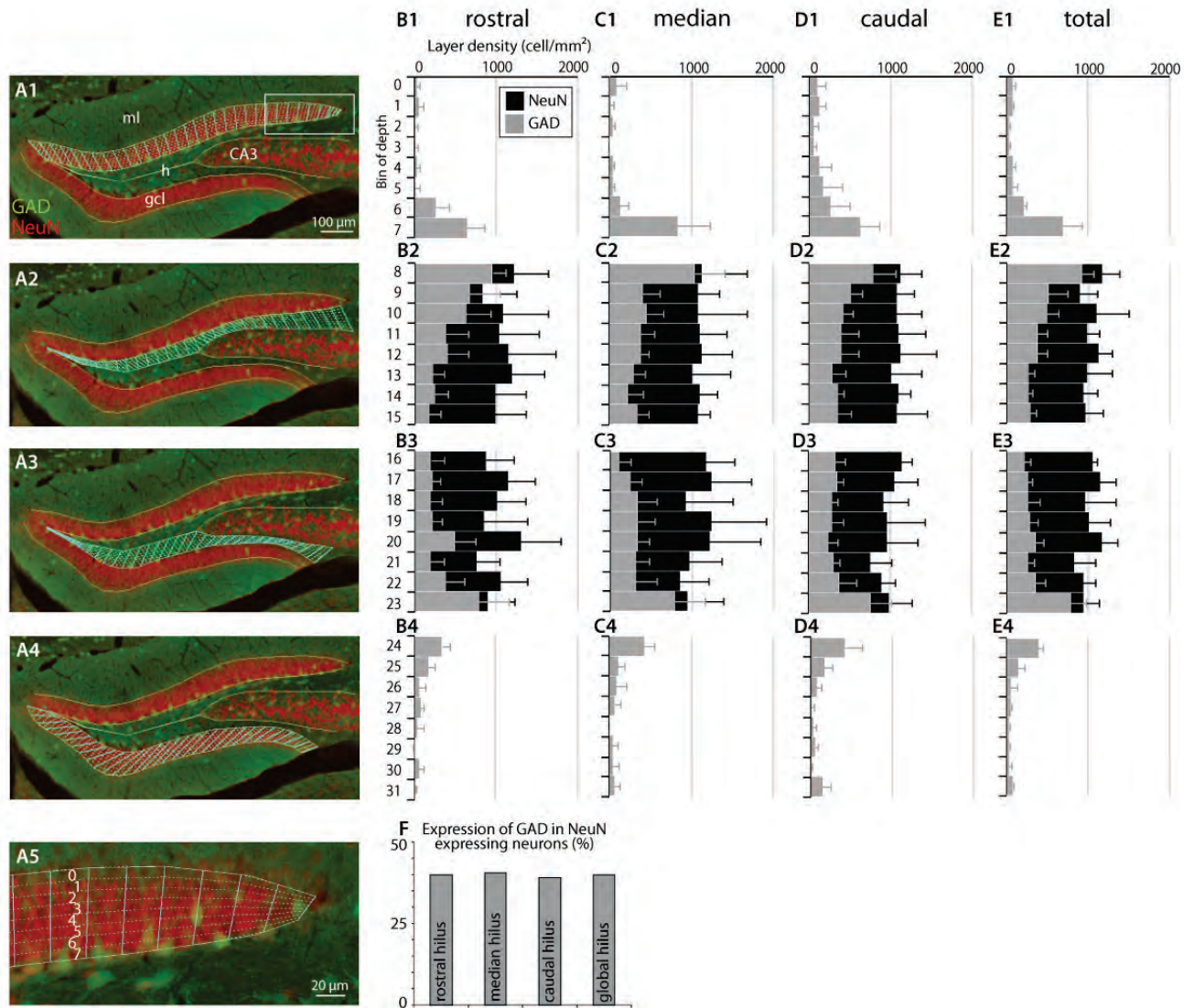


Figure 1: GAD67 and NeuN expression across the hilus and granular cell layer of the dentate gyrus. **A1-A4.** Representative photomicrographs of GFP and NeuN expression in a rostral slice of dentate gyrus of GAD67-GFP knock-in mice. photomicrographies showing the division into 8 bins of the following areas: **A1.** granular cell layer outer blade (bin 0 to 7), **A2.** hilar outer half (bin 8 to 15), **A3.** hilar inner half (bin 16 to 23) and **A4.** granular cell layer inner blade (bin 24 to 31). Gcl: granular cell layer, h: hilus, ml: molecular layer. The delineated area in A1 is enlarged in **A5**. **B1 (C1, D1, E1 respectively).** Histograms of the densities in rostral (median, caudal, global resp.) slices of GFP expressing cells (grey) in bins 0 to 7. **B2 (C2, D2, E2 respectively).** Histograms of the densities in rostral (median, caudal, global resp.) slices of GFP expressing cells (grey) and NeuN expressing cells (black) in bins 8 to 15. **B3 (C3, D3, E3 respectively).** Histograms of the densities in rostral (median, caudal, global resp.) slices of GFP expressing cells (grey) and NeuN expressing cells (black) in bins 16 to 23. **B4 (C4, D4, E4 respectively).** Histograms of the densities in rostral (median, caudal, global resp.) slices of GFP expressing cells (grey) in bins 24 to 31. **f.** Expression of GAD in NeuN expressing cells in percentage. (n=7 mice, error bars: sem).

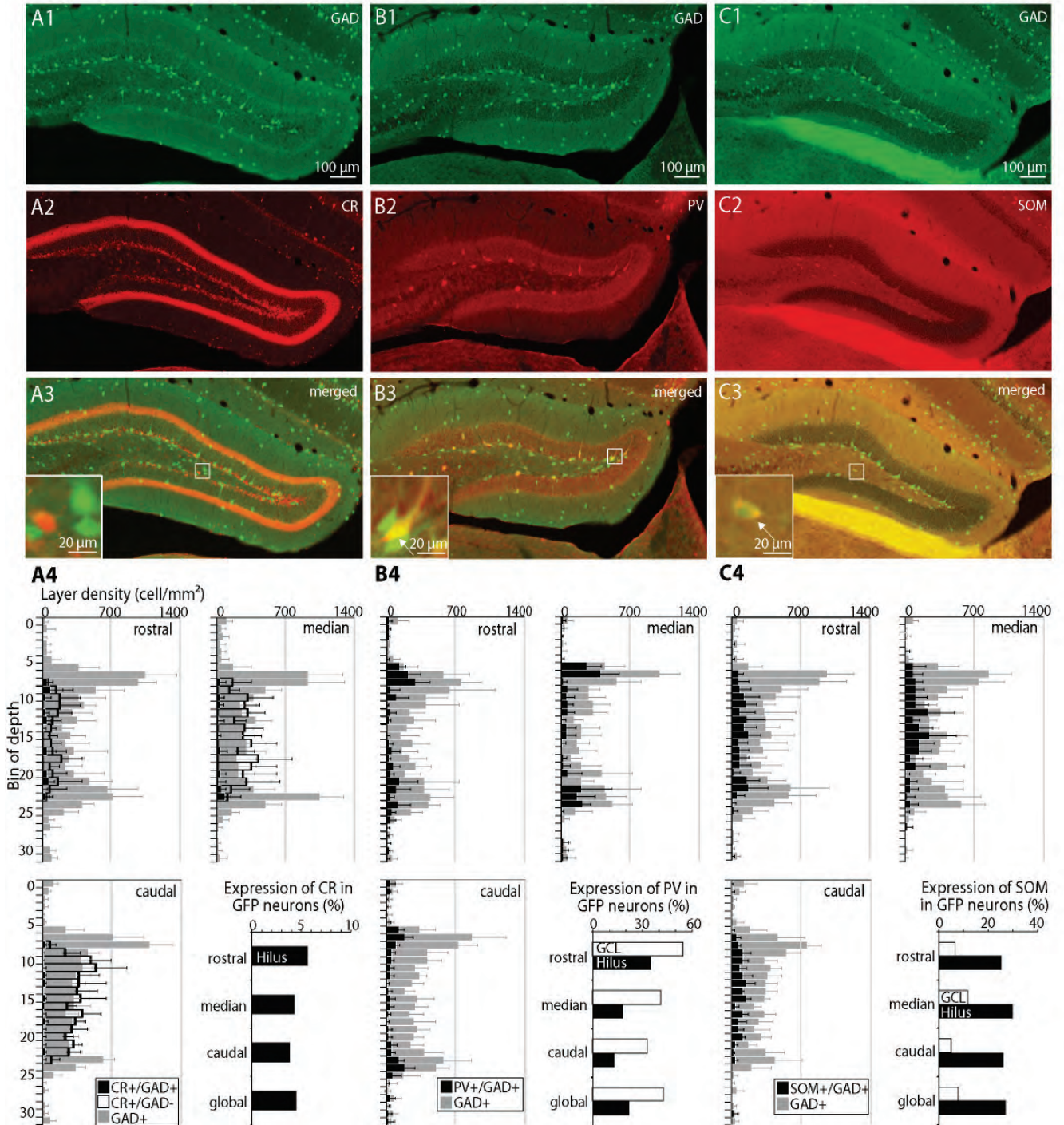


Figure 2: Distribution of CR, PV and SOM immunoreactivity in GABAergic interneurons in the hilus and the granular cell layer of the dentate gyrus. **A1-A3.** CR immunostaining in the dentate gyrus of a GAD-GFP knock-in mouse. **A3.** The delineated area is enlarged in the inset. **A4.** Densities, from top to bottom, in rostral, median, caudal slices and the global mean of GFP expressing cells (grey) in bins 0 to 31, CR expressing cells (black outline) and both CR and GFP expressing cells (black) in bins 8 to 23. The histogram in the bottom right represents the expression of CR in GAD expressing cells in percentage in the hilus (H). **B1-B3.** PV immunostaining in the dentate gyrus of a GAD-GFP knock-in mouse at 10X magnification. **B3.** delineated area is enlarged in the inset. Examples of GAD-expressing neurons labeled with PV are pointed out with arrows. **B4.** The histograms represent the densities, from top to bottom, in rostral, median, caudal slices and the global mean of GFP expressing cells (grey) and PV expressing cells (black) in bins 0 to 31. The histogram in the bottom right represents the expression of PV in GAD expressing cells in percentage in the hilus (H) and granular cell layer (GCL). **C1-C4.** As described in B1-B4 for SOM. (n=7 mice/marker, error bars: sem).

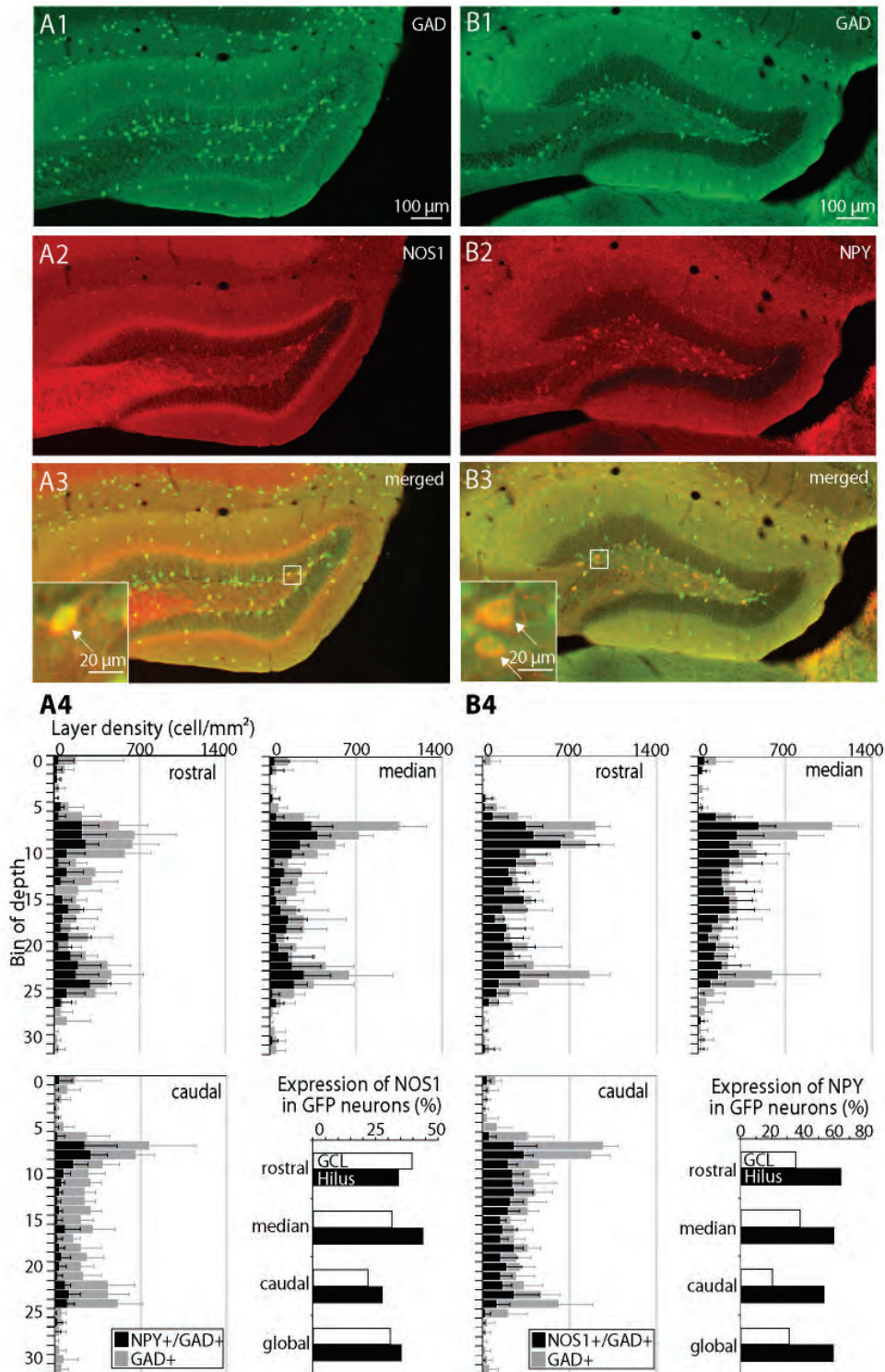


Figure 3: Distribution of the expression of NOS-1 and NPY in GABAergic interneurons in the hilus and the granular cell layer of the dentate gyrus. **A1-A3.** NOS-1 immunostaining in the dentate gyrus of a GAD-GFP knock-in mouse. **A3.** The delineated area is enlarged in the inset. Examples of GAD-expressing neurons labeled with NOS1 are pointed out with arrows. **A4.** The histograms represent the densities, from top to bottom, in rostral, median, caudal slices and the global mean of GFP expressing cells (grey) and NOS1 expressing cells (black) in bins 0 to 31. The last histogram represents the expression of NOS1 in GAD expressing cells in percentage in the hilus (H) and granular cell layer (GCL). **B1-B4.** As described in A1-A4 for NPY. (n=7 mice/marker, error bars: sem).

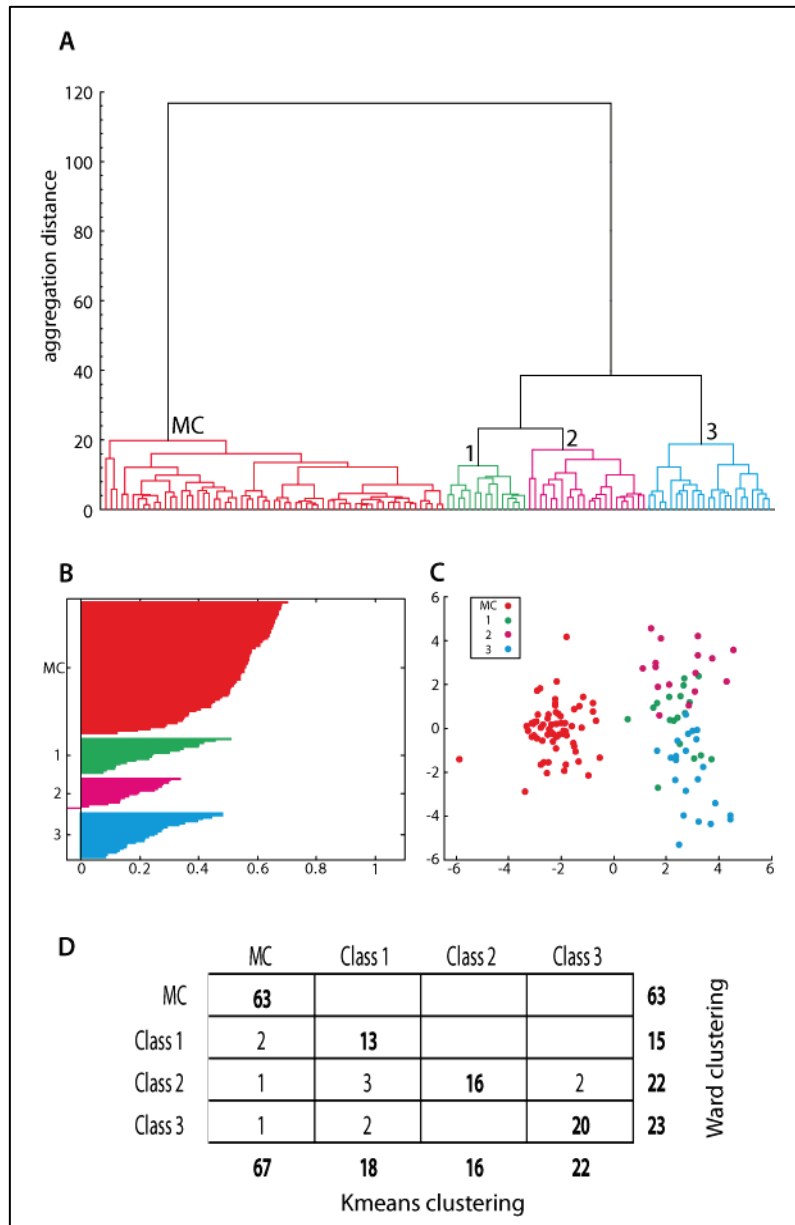


Figure 4: Hilar neurons segregate into 4 main classes. **A.** Ward’s unsupervised clustering applied to 123 neurons disclosed 4 clusters of cells. The x axis represents the individual cells and the y axis the distance of aggregation (see Material & Methods) in a space of 18 electrophysiological parameters and 7 parameters representing molecular marker expression. Three clusters of interneurons named respectively class 1, class 2 and class 3 were identified. They form a supercluster that segregates well from glutamatergic putative mossy cells (MC). **B.** Cluster silhouettes plot: the x axis represents the silhouette value and the y axis the cells sorted by clusters. Each Individual cell is represented by an horizontal line. **C.** Two dimensional projection of the same set of neurons following principal component analysis (PCA): the x axis and y axis are the first and second order components of the PCA. Individual cells are represented by black crosses (putative mossy cells), white dots (class 1), grey dots (class 2) and black dots (class 3) at their respective coordinates. **D.** Matching table of Ward clusters and clusters generated by the K-means algorithm initialized on Ward clusters centroids. The K-means algorithm corrects cells mis-assigned by Ward method through the generation of non-overlapping clusters.

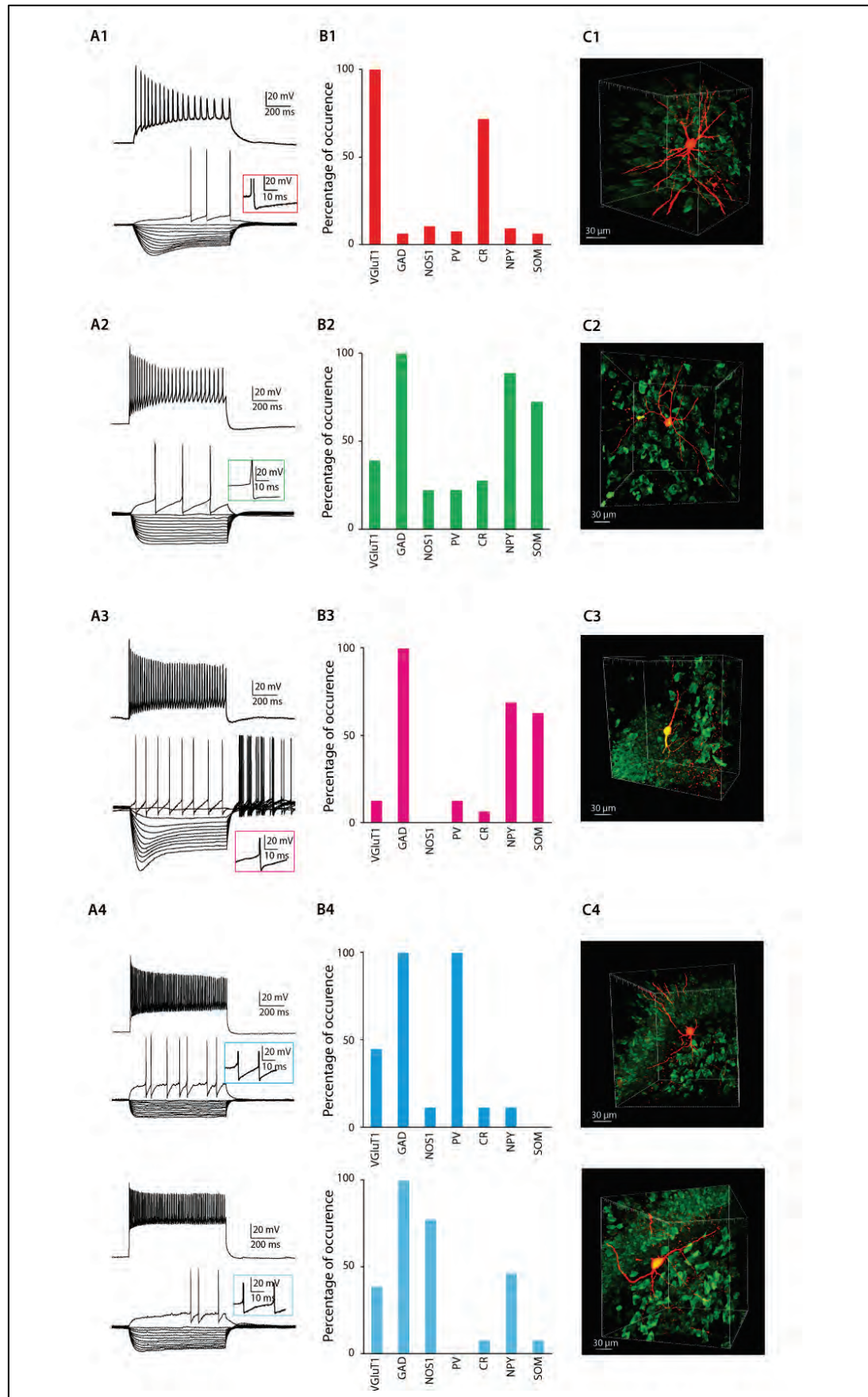


Figure 5: A1-C1. Multiparametric characterization of putative mossy cells (n=67). **A1.** Electrophysiological behavior of a representative cell of the cluster. Voltage responses are induced by current injections: -100 to 0 pA by increments of 10 pA and rheobase (bottom trace) and last step of current before saturation (top trace). After hyperpolarization potential (AHP) of the first spike at rheobase is enlarged in the inset. **B1.** Occurrence of molecular markers (in %). **C1.** 3D representation of the morphology of a representative cell of the cluster after biocytin revelation. **A2-C2.** Multiparametric characterization of class 1 neurons. (n=18). As described in A1-C1 for class 1 neurons. **A3-C3.** Multiparametric characterization of class 2 neurons. (n=16 neurons). As described in A1-C1 for class 2 neurons. **A4-C4.** Multiparametric characterization of class 3 neurons. (n=22). As described in A1-C1 for subclass 3.1 neurons (top line, n=9) and subclass 3.2 neurons (bottom line, n=13).

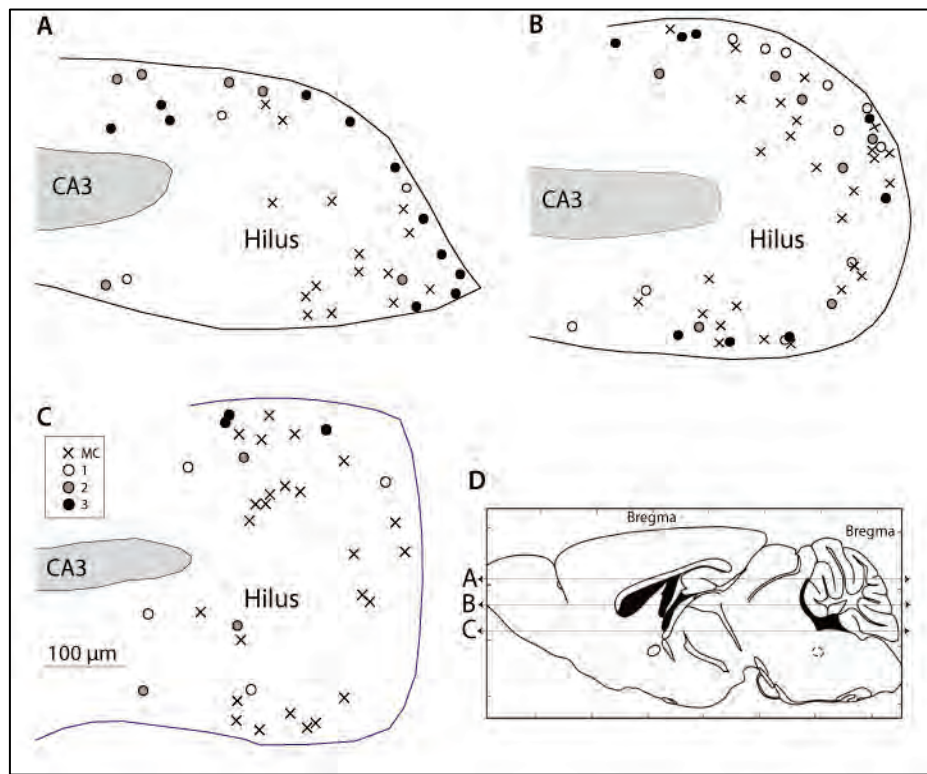


Figure 6 : Localization of the characterized neurons across the hilus. **A.** Schematic representation of a dorsal slice of the dentate gyrus. Individual cells are represented by black triangles (mossy cells), black circles (class 1), black crosses (class 2) and white circles (class 3) (n=39 neurons). **B.** As described in A. for median dentate gyrus. (n=56 neurons) **C.** As described in A. for ventral dentate gyrus. (n=38 neurons). **D.** The lines A, B, C correspond to the localizations of the horizontal sections represented in A, B and C respectively.

Genes		First PCR primers	Size		Second PCR primers	Size
GAD67	sense	ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC	253	sense	CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCG	177
NM_008077.2	antisense	GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG		antisense	GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG	
GAD65	sense	CCAAAAGTTCACGGGCGG	375	sense	CACCTGCGACCAAAAACCT	248
NM_008078.1	antisense	TCCTCCAGATTTTGC GGTTG		antisense	GATTTTGC GGTTGGTCTGCC	
CR	sense	TTGATGCTGACGGAAATGGGTA	265	sense	GCTGGAGAAGGCAAGGAAGG	151
NM_007586.1	antisense	CAAGCCTCCATAAACTCAGCG		antisense	ATTCTCTTCGGTTCGGCAGGAT	
PV	sense	GCCTGAAGAAAAAGAACCCG	275	sense	CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT	163
NM_013645.2	antisense	AATCTTGCCGTCCTCCATCCT		antisense	TCCCCATCCTTGTCTCCAGC	
SOM	sense	ATGCTGTCTGCGTCTCCA	250	sense	GCATCGTCTGGCTTTGGG	170
NM_009215.1	antisense	GCCTCATCTCGTCTGCTCA		antisense	GGGCTCCAGGGCATCATTCT	
NPY	sense	CGAATGGGGCTGTGTGGA	297	sense	CCCTCGCTCTATCTGCTCGT	220
NM_023456.2	antisense	AAGTTTCATTTCCCATCACCACAT		antisense	GCGTTTTCTGTGCTTTCCTTCA	
NOS1	sense	CCTGGGGCTCAAATGGTATG	373	sense	CCTGTCCCTTATAGTGGCTGGTA	236
NM_008712.1	antisense	CACAATCCACCCAGTCGG		antisense	GATGAAGGACTCGGTGGCAGA	
VGluT1	sense	CCCTTAGAACGGAGTCGGCT	593	sense	ACGACAGCCTTTTGC GGTTT	367
NM_182993.1	antisense	TATCCGACCACCAGCAGCAG		antisense	CAAAGTAGCGGGCTGAGAG	

Table 1 : PCR primers

	Mossy Cells n=67	Class 1 n=18	Class 2 n=16	Class 3 n=22
(1) Resting potentiel (mV)	-52,4 ± 0,6	-47,3 ± 1,2 >>MC >2	-50,2 ± 1,2	-56,5 ± 0,9 <<<MC 1 2
(2) Input resistance (MΩ)	518 ± 22 >>>3 >1	411 ± 34	1029 ± 102 >>>MC 1 2	368 ± 33
(3) Membrane time constant (ms)	95,2 ± 4,8 >>>1 2 3	31,3 ± 3,3 >3	61,3 ± 4,3 >>>2 3	22,9 ± 2,1
(4) Membrane capacitance (pF)	196 ± 13,3 >>>1 2 3	76,6 ± 4,4	67,0 ± 6,8	67,8 ± 5,2
(5) R _{hyp} (MW)	362 ± 8	335 ± 26	763 ± 71 >>>MC 1 2	317 ± 27
(6) R _{sag} (MW)	244 ± 6	280 ± 27	625 ± 56 >>>MC 1 2	288 ± 24
(7) Sag ratio (%)	67,6 ± 0,8 <<<1 2 3	83,2 ± 3,2	82,3 ± 3,5	91,4 ± 1,3 >2

Table 2: Passive membrane properties. n: number of cells; <, << and <<<: inferior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively; >, >> and >>>: superior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

	Mossy Cells n=67	Class 1 n=18	Class 2 n=16	Class 3 n=22
(8) Rheobase (pA)	26,4 ± 1,8	40,0 ± 7,0	13,1 ± 3,5 <<MC 1	71,8 ± 9,9 >>>MC 2 >>1
(9) First spike latency (ms)	489 ± 26 >>>1 2 3	222 ± 57	122 ± 35	308 ± 39 >>2
(10) Adaptation (Hz/ms)	1,0 ± 2,5	-5,0 ± 8,7	9,6 ± 8,7	-14,9 ± 4,2 <<MC <2
(11) Minimal steady-state frequency (Hz)	9,5 ± 0,5	14,2 ± 3,2	10,1 ± 2,0	14,5 ± 1,9 >MC

Table 3: Just above threshold properties. n: number of cells; <, << and <<<: inferior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively; >, >> and >>>: superior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

	Mossy Cells n=67	Class 1 n=18	Class 2 n=16	Class 3 n=22
(12) Amplitude of late adaptation (Hz)	10,2 ± 4,1	34,1 ± 3,2 >>>MC >2	22,2 ± 3,4 >MC	54,4 ± 5,3 >>>MC 2 >>1
(13) Time constant of late adaptation (ms)	75,6 ± 17,5 >2	52,1 ± 8,1	66,9 ± 12,2 >3	40,4 ± 6,2
(14) Maximal steady state frequency (Hz)	42,2 ± 2,4 <<<3 <<1 <2	58,9 ± 5,9	50,3 ± 4,2	73,1 ± 7,8 >2
(15) Late adaptation (Hz/ms)	-23,5 ± 3,2 <1 2	-12,1 ± 2,5	-10,2 ± 2,7	-25,1 ± 4,4 <<2 <1
(16) Mean instant frequency (Hz)	35,5 ± 1,1 <<<1 2 3	57,2 ± 5,2	49,6 ± 3,9	69,7 ± 6,1 >2

Table 4: Firing properties. n: number of cells; <, << and <<<: inferior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively; >, >> and >>>: superior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

	Mossy Cells n=67	Class 1 n=18	Class 2 n=16	Class 3 n=22
(17) First spike amplitude (mV)	89,2 ± 0,9 >>>1 2 3	71,6 ± 1,8 >>3	69,2 ± 3,0	63,2 ± 2,0
(18) First spike duration (ms)	1,22 ± 0,02 >>>1 >>2 >3	0,87 ± 0,05 <2	1,05 ± 0,06	1,00 ± 0,08
(19) First spike AHP maximum (mV)	-8,1 ± 0,2 >>>1 2 3	-18,7 ± 1,0	-21,5 ± 1,2	-19,5 ± 0,7
(20) First spike AHP max latency (ms)	5,8 ± 0,7	5,3 ± 0,5	11,9 ± 5,6	7,2 ± 0,9
(21) Second spike amplitude (mV)	86,3 ± 0,8 >>>1 2 3	63,7 ± 2,0	68,3 ± 2,8	64,8 ± 1,8
(22) Second spike duration (ms)	1,27 ± 0,02 >>>1 >>2 3	0,95 ± 0,06	1,08 ± 0,06	1,00 ± 0,08
(23) Second spike AHP maximum (mV)	-7,8 ± 0,3 <<<1 2 3	-20,4 ± 0,9	-20,9 ± 1,2	-18,6 ± 0,7
(24) Second spike AHP max latency (ms)	7,9 ± 1,6	6,4 ± 0,7	12,5 ± 5,9	7,4 ± 1,0
(25) Amplitude reduction	3,3 ± 0,2	10,9 ± 1,9 >>>MC 2 3	0,7 ± 1,9	-3,2 ± 1,7 <<<MC
(26) Duration increase	4,3 ± 0,2	8,4 ± 1,4 >>>MC 3 >>2	3,4 ± 1,0	-0,6 ± 1,0 <<<MC <2

Table 5: Action potentials properties. n: number of cells; <, << and <<<: inferior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively; >, >> and >>>: superior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

	Mossy Cells n=67	Class 1 n=18	Class 2 n=16	Class 3.1 n=9	Class 3.2 n=13
VGluT1	100% >>>1 2 3 4	39%	13%	33%	39%
GAD	6% <<<1 2 3 4	100%	100%	100%	100%
NOS1	10%	22% >2	0%	11%	77% >>>MC 2 >>1 3
PV	6%	22% >MC	13%	100% >>>MC 1 2 4	0%
CR	72% >>>1 2 3 4	28%	6%	11%	8%
NPY	9%	89% >>>MC 3 >>4	69% >>>MC >>3	11%	46% >>>MC
SOM	6%	72% >>>MC 3 4	63% >>>MC >>3 4	0%	8%

Table 6: Molecular properties. n: number of cells; <, << and <<<: inferior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively; >, >> and >>>: superior with $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

Discussion

Using transgenic mice expressing GFP under the control of the GAD67 promoter, we first assessed the location and the repartition in the hilus of GABAergic interneurons compared to glutamatergic neurons. Second, the neurochemical identity of DG GABAergic cells was investigated by immunolabellings against Calretinin (CR), Parvalbumin (PV), Somatostatin (SOM), Neuropeptide Y (NPY), Nitric Oxide Synthase 1 (NOS-1) and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) throughout the hilus and granule cell layer. To further study the diversity of hilar neuronal populations, we examined the potential correlation between electrophysiological and molecular properties using patch-clamp recordings combined with scRT-PCR and biocytin labelling of individual neurons. Unsupervised clustering allowed the identification of one homogenous population of glutamatergic mossy cells and 3 distinct classes of GABAergic interneurons. Among these GABAergic interneurons, we were able to characterize two distinct populations of adapting neurons mainly expressing NPY and SOM mRNAs, and fast spiking neurons expressing either PV or NOS-1 mRNAs.

Distribution of GABAergic vs non GABAergic neurons in the hilus

Previous studies have focused on the distribution of GABAergic neurons within the DG and their abundance compared to excitatory cells (Ribak et al., 1978; Sloviter and Nilaver, 1987; Babb et al., 1988; Woodson et al., 1989, Jinno et al., 1998). Nevertheless, GABAergic neurons in the hilus were often underdetected by immunolabellings of GABA or GAD, and consequently the results were not consistent with studies using GAD *in situ* hybridization (Houser and Esclapez, 1994; Houser, 2007). Using GAD-67 GFP transgenic mice (Tamamaki et al., 2003) allowed us to precisely assess the distribution and density of GABAergic neurons among the whole neuronal population visualized by immunolabelling of NeuN. The distribution of GABAergic neurons that we describe here, is consistent with that reported after *in situ* hybridization of GAD mRNA (Houser et al 2000;

Houser et al 2007). GABAergic neurons appear mainly located in the hilus and have a tendency to be clustered at the border between the hilus and the granule cell layer. In contrast, non-GABAergic neurons are more scattered throughout hilar deepness and are supposed to correspond to mossy cells, which are glutamatergic (Soriano and Frotscher, 1994; Wenzel et al., 1997). Excitatory cells are the predominant neuron type of the hilus (Amaral, 1978; Liu et al., 1996). The proportions of excitatory and inhibitory cells (60% and 40% respectively) that we describe are rather similar to that already described (Buckmaster and Jongen-Rêlo, 1999).

Identification of different classes among hilar neurons

Different classification schemes of hilar interneurons have been proposed based on their morphological features, their neuropeptides and calcium-binding proteins content, and their electrophysiological behaviors (Han et al, 1993; Halasy and Somogyi, 1993; Freund and Buzsaki, 1996; Acsady et al., 2000; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Houser, 2007; Jinno and Kosaka, 2002; Lubke et al., 1998; Mott et al., 1997). However, no clear correlation between individual features has been yet established for a specific hilar DG interneuron, leading to the theory that each interneuron might be unique (Mott et al., 1997). In the present study, we chose to adopt an unsupervised approach, to eliminate personal bias, by using Ward's method. This method has been widely used to implement neuronal classifications (Tamas et al., 1997; Cauli et al., 2000; Dumitriu et al., 2006; Gallopin et al., 2006; David et al., 2007). It has the advantage not to require any predetermined number of classes. Nevertheless, because of its iterative nature, it encounters some limitations like the inability to correct for potential misclassifications. That is the reason why we combined Ward's clustering with K-means algorithm (Karagiannis et al., 2009; McGarry et al., 2010; Tricoire et al., 2011; Perrenoud et al., 2012).

Based on our data, the distinction between VGluT1 positive cells and glutamatergic cells may be misleading. In the neocortex, glutamatergic neurons all express VGluT1, which is believed to be

the determinant of the glutamatergic phenotype (Herzog et al., 2001). However, our detection of VGLUT1 mRNA in some GABAergic interneurons is consistent with its reported expression in GABAergic interneurons in the cortex (Gallopín et al., 2006; Karagiannis et al., 2009; Zander et al., 2010) and also in several GABAergic cell types throughout the brain (Danik et al., 2005). Nonetheless, the absence of VGLUT1 immunoreactivity in symmetrical synapses (Alonso-Nanclares et al., 2004) and the clear GABAergic phenotype of interneuron output in the DG suggest a low level of VGLUT1 expression in these interneurons. Therefore, at the molecular level, glutamatergic cells correspond to cells expressing VGLUT1 but neither GAD65 nor GAD67.

Mossy cells, the main excitatory cells of the hilus

In agreement with previous studies, we could reliably identify the excitatory neuronal population emerging from our cluster analysis as mossy cells considering their striking electrophysiological properties previously described (Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Lubke et al., 1998; Henze and Buzsáki, 2007). Indeed, these cells display low firing rate and are characterized by their high input resistance, high time constant and capacitance and strong inward rectification in response to hyperpolarized current steps. Our results also show that mossy cells systematically expressed VGLUT1 mRNA without any detection of GAD mRNA confirming their glutamatergic nature (Soriano and Frotscher, 1994; Wenzel et al., 1997; Fujise et al., 1998). They also exhibit a high expression of CR mRNA (Murakawa and Kosaka, 2001), together with a very low expression of markers usually typical of inhibitory interneurons. The non-systematic detection of CR by scRT-PCR could be explained by dorsoventral differences. Indeed, previous studies have pointed out the variability of CR immunoreactivity intensity along the dorsoventral extend of the mouse dentate gyrus (Liu et al., 1996; Blasco-Ibanez and Freund, 1997; Fujise et al., 1998; Houser, 2007). If dense ventral mossy cells are strongly positive for CR, dorsal mossy cells appear, on the contrary, to be faintly stained and scattered with a lower density. Moreover, the mossy cells recorded in our experiments are located within the whole hilar deepness, consistent with our

findings from CR immunostaining. Finally, biocytin-labeled cells are multipolar and are covered with spines and thorny excrescences, which fits with previous morphological descriptions of mossy cells (Amaral, 1978; Freund and Buzsaki, 1996; Henze and Buzsaki, 2007; Frotscher et al., 1991).

NPY- and SOM-expressing interneurons in the hilus dentate gyrus

Our study confirms that NPY and SOM are extensively expressed in hilar GABAergic interneurons and are quite evenly distributed throughout the hilus (Jinno and Kosaka, 2003; Houser, 2007). Their expression is often overlapping (Kohler et al., 1987; Deller and Leranth, 1990, Chan-Palay, 1987; Kosaka et al., 1988; Esclapez and Houser, 1995; Fu and Van den Pol, 2007; Houser, 2007; Jinno and Kosaka, 2003) which is evidenced by our scRT-PCR results showing NPY and SOM mRNAs co-expression in two different classes of cells. Indeed, the cluster analysis segregated these NPY/SOM neurons into class 1 and class 2 that mainly differ by their electrophysiological behavior and by some morphological features. Many SOM- and NPY-expressing interneurons in the hilus are considered to correspond to the hilar perforant path-associated (HIPP) cells, consistent with their axon terminals located in the outer molecular layer of the DG (Bakst et al., 1986; Han et al 1993; Katona et al., 1999; Deller and Leranth, 1990).

Class 1 neurons displayed typical electrophysiological behavior: short-duration action potentials, pronounced adaptation and weak inward rectifying current after hyperpolarizing pulses. These NPY/SOM expressing cells were located in the deep hilus and had a dendritic arborization restricted to the hilus. Their overall features fit well with the electrophysiological (Scharfman, 1992; Mott et al., 1997; Lubke et al., 1998; Sik et al., 1997), molecular and morphological (Bakst et al., 1986; Katona et al., 1999; Freund and Buzsaki, 1996; Tallent, 2007; Houser, 2007; Sik et al, 1997; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Katona et al., 1999) characterization of HIPP cells. At the functional level, HIPP cells could play an essential role in feedback inhibition in the DG, as

their axon collaterals modulate the inputs to granule cells dendrites, enabling them to modulate the influence of the perforant path.

Class 2 neurons, as well as class 1 neurons, were shown to strongly express SOM and NPY mRNAs. But unlike class 1 neurons, the shape of their soma is fusiform and they disclose a bipolar dendritic tree with dendrites located either in the hilus or crossing the granule cell layer and extending in the molecular layer. For two neurons, the axon is visible in the molecular layer. Several studies have pointed out the preeminence of fusiform interneurons expressing SOM and NPY and forming a dense axonal plexus in the outer molecular layer (Bakst et al., 1986; Ribak and Seress, 1988; Milner and Bacon, 1989; Deller and Leranthe, 1990; Leranthe et al., 1990; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Ribak and Shapiro, 2007). Thus, we hypothesize that class 2 neurons correspond to these SOM-expressing fusiform interneurons. Yet, whether they should be considered as a subgroup of HIPP cells or as a distinct group of neurons, remains unclear (Freund and Buzsaki, 1996; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Ribak and Seress, 1988; Ribak and Shapiro, 2007). Indeed, SOM-expressing fusiform interneurons display the general morphological and neurochemical features of HIPP cells, though with some additional characteristics: their soma is located close to the granular cell layer and has a fusiform shape. In the future, it will be important to better characterize SOM expressing neurons in the hilus dentate gyrus, especially because these cells have been reported to be the first damaged in pathological conditions (Sloviter, 1987; Sperk et al, 1992; Buckmaster and Dudeck, 1997).

Fast spiking PV neurons

Besides NPY/SOM neurons, our analysis points out the specificities of subclass 3.1 cells. The features of these cells match quite well those of basket or axo-axonic cells. Indeed, they typically express PV (Ribak et al., 1990; Freund and Buzsaki, 1996; Kosaka et al., 1987; Katsumaru et al., 1988; Sloviter, 1989; Celio, 1990; Nitsch et al., 1990; Gulyas et al., 1991), exhibit a high rheobase

and are able to fire high frequency spikes trains (Kawaguchi et al., 1987; Pawelzik et al., 2002; Freund, 2003; Lubke et al., 1998; Szabadics and Soltesz, 2009; Tricoire et al., 2011; Zhang and Buckmaster, 2009). Their cell bodies are located along the border of the granule cell layer and are mainly pyramidal in shape, with long apical dendrites (Freund and Buzsaki, 1996; Kosaka et al., 1987; Nitsch et al., 1990; Ribak et al., 1990; Ribak and Seress, 1983; Ribak and Anderson, 1980). The distribution in the hilus of class 3.1 biocytin-labeled cells matched quite well the distribution observed in our PV-immunolabellings analysis. The number of cells segregated in class 3.1 was relatively low, which is consistent with previous reports (Ribak et al., 1990; Jinno and Kosaka, 2002). These fast spiking (FS) PV basket or axo-axonic cells contribute to the GABAergic terminals within the granule cell layer (Han et al 1993). They could provide strong feedback inhibition to the granule cells.

NOS-1-expressing neurons

The main feature defining the neurons of class 3.2, is their high expression of NOS-1, and to a lesser extent, of NPY with seldom SOM. This molecular signature is quite similar to that of ivy/neurogliaform interneurons of the hippocampus (Fuentelba et al., 2008; Tricoire et al., 2010). Furthermore, these NOS-expressing cells exhibit typical physiological features of ivy/neurogliaform cells, such as high rheobase, long latency to fire at near threshold and modest spike frequency adaptation (Tamas et al 2003; Price et al 2005; Fuentelba et al., 2008; Karagiannis et al. 2009; Tricoire et al., 2010; Amstrong et al 2011; Markwardt et al., 2011). Interestingly, although the morphology of ivy/neurogliaform cells has been well described (Price et al., 2005; Fuentelba et al., 2008; Tricoire et al., 2010; Krook-Magnuson et al., 2011), no correlations have ever been established between ivy/neurogliaform cells and the widely accepted classification of DG interneurons, based on morphological criteria (Freund and Buzsaki, 1996; Lubke et al 1998; Mott et al 1997). We suggest that the putative ivy/neurogliaform cells emerging from our analysis could constitute a subpopulation of HICAP cells. Indeed,

ivy/neurogliaform cells exhibit thin axons that form a very dense local axonal plexus around their cell bodies and that innervate the granule cell layer (Markwardt et al., 2011). As for HICAP cells, the soma of ivy/neurogliaform cells are usually located in the subgranular zone of the hilus, and their axon collaterals mainly innervate the inner third of the molecular layer and the granule cell layer, and the hilar interneurons in a sparse manner (Sik et al., 1997; Freund and Buszaki, 1996). Besides, HICAP cells are characterized by NOS-1 expression (Freund and Buszaki, 1996). Moreover, several studies have described a group of NPY neurons, similar to PV expressing cells, that did not express SOM, that had a pyramidal shape and a soma located in the subgranular layer (Freund and Buzsaki, 1996; Kohler et al., 1987; Deller and Leranth, 1990).

Thus, considering these morphological, molecular and electrophysiological arguments, ivy/neurogliaform cells may well be a subtype of HICAP cells. Recent data have demonstrated that ivy/neurogliaform cells contribute, by innervating newly born granule cells, to their functional maturation and coordinate neuronal activity in the neurogenic niche (Markwardt et al., 2011). Thus, further exploration of this hilar population of cells may improve our understanding of adult neurogenesis regulation in the healthy and diseased brain (Jinno and Kosaka, 2004; Jin et al., 2004 ; Boekhoorn et al., 2006; Verret et al., 2007; Palop et al., 2007; Sun et al., 2009).

In conclusion, by clarifying the diversity of DG hilar neurons in the adult mouse brain, this study establishes a solid database for future investigations designed to elucidate the physiological role of DG hilar neurons, for instance regarding the regulation of adult hippocampal neurogenesis in the healthy brain as in neurological disorders such as epilepsy or Alzheimer's disease.

References

- Acsady L, Katona I, Martinez-Guijarro FJ, Buzsaki G, Freund TF. 2000. Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J Neurosci* 20:6907-6919.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Amaral DG. 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851-914.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.
- Ascoli GA, Ono-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Avides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A and others. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Brown WJ. 1988. Distribution of glutamate-decarboxylase-immunoreactive neurons and synapses in the rat and monkey hippocampus: light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 278:121-138.
- Bakst I, Avendano C, Morrison JH, Amaral DG. 1986. An experimental analysis of the origins of somatostatin-like immunoreactivity in the dentate gyrus of the rat. *J Neurosci* 6:1452-1462.
- BLACKSTAD TW. 1958. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat. *Acta Anat (Basel)* 35:202-214.
- Blasco-Ibanez JM, Freund TF. 1997. Distribution, ultrastructure, and connectivity of calretinin-immunoreactive mossy cells of the mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 7:307-320.
- Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. 2006. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24:1-14.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der BW, Kempermann G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603-613.
- Buckmaster PS, Schwartzkroin PA. 1995. Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci* 15:774-789.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E. 2000. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6144-6149.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.

- Chan-Palay V. 1987. Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol* 260:201-223.
- Danik M, Cassoly E, Manseau F, Sotty F, Mouginot D, Williams S. 2005. Frequent coexpression of the vesicular glutamate transporter 1 and 2 genes, as well as coexpression with genes for choline acetyltransferase or glutamic acid decarboxylase in neurons of rat brain. *J Neurosci Res* 81:506-521.
- David C, Schleicher A, Zuschratter W, Staiger JF. 2007. The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *Eur J Neurosci* 25:2329-2340.
- Dumitriu D, Cossart R, Huang J, Yuste R. 2007. Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb Cortex* 17:81-91.
- Esclapez M, Houser CR. 1995. Somatostatin neurons are a subpopulation of GABA neurons in the rat dentate gyrus: evidence from colocalization of pre-prosomatostatin and glutamate decarboxylase messenger RNAs. *Neuroscience* 64:339-355.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund TF. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.
- Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E. 1991. The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol* 312:145-163.
- Fu LY, van den Pol AN. 2007. GABA excitation in mouse hilar neuropeptide Y neurons. *J Physiol* 579:445-464.
- Fuentealba P, Begum R, Capogna M, Jinno S, Marton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi P, Klausberger T. 2008. Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57:917-929.
- Fujise N, Liu Y, Hori N, Kosaka T. 1998. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. *Neuroscience* 82:181-200.
- Gallopin T, Geoffroy H, Rossier J, Lambollez B. 2006. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16:1440-1452.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. 2008. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586:3759-3765.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I. 2001. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11:626-636.

- Gulyas AI, Toth K, Danos P, Freund TF. 1991. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 312:371-378.
- Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA. 2006. Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96:834-845.
- Hargreaves EL, Rao G, Lee I, Knierim JJ. 2005. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* 308:1792-1794.
- Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D. 2009. L2/3 interneuron groups defined by multiparameter analysis of axonal projection, dendritic geometry, and electrical excitability. *Cereb Cortex* 19:951-962.
- Henze DA, Buzsaki G. 2007. Hilar mossy cells: functional identification and activity in vivo. *Prog Brain Res* 163:199-216.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El MS. 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.
- Houser CR. 2007. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog Brain Res* 163:217-232.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. 2004. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13363-13367.
- Jinno S, Aika Y, Fukuda T, Kosaka T. 1998. Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical disector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res* 814:55-70.
- Jinno S, Kosaka T. 2002. Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *J Comp Neurol* 449:1-25.
- Jinno S, Kosaka T. 2003. Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J Comp Neurol* 461:333-349.
- Jinno S, Kosaka T. 2004. Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector. *Neuroscience* 124:797-808.
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B. 2009. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29:3642-3659.
- Karube F, Kubota Y, Kawaguchi Y. 2004. Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. *J Neurosci* 24:2853-2865.

- Katona I, Acsady L, Freund TF. 1999. Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88:37-55.
- Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. 1988. Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 72:347-362.
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. 1987. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res* 416:369-374.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW. 1987. GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419:119-130.
- Kosaka T, Wu JY, Benoit R. 1988. GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Exp Brain Res* 71:388-398.
- Krook-Magnuson E, Luu L, Lee SH, Varga C, Soltesz I. 2011. Ivy and neurogliaform interneurons are a major target of mu-opioid receptor modulation. *J Neurosci* 31:14861-14870.
- Larimer P, Strowbridge BW. 2008. Nonrandom local circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci* 28:12212-12223.
- Leranth C, Malcolm AJ, Frotscher M. 1990. Afferent and efferent synaptic connections of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *J Comp Neurol* 295:111-122.
- Liu Y, Fujise N, Kosaka T. 1996. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description. *Exp Brain Res* 108:389-403.
- Lubke J, Frotscher M, Spruston N. 1998. Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata. *J Neurophysiol* 79:1518-1534.
- Markwardt SJ, Dieni CV, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2011. Ivy/neurogliaform interneurons coordinate activity in the neurogenic niche. *Nat Neurosci* .
- McGarry LM, Packer AM, Fino E, Nikolenko V, Sippy T, Yuste R. 2010. Quantitative classification of somatostatin-positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. *Front Neural Circuits* 4:12.
- Milner TA, Bacon CE. 1989. Ultrastructural localization of somatostatin-like immunoreactivity in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 290:544-560.
- Mott DD, Turner DA, Okazaki MM, Lewis DV. 1997. Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity. *J Neurosci* 17:3990-4005.
- Nafstad PH. 1967. An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 76:532-542.

- Nitsch R, Soriano E, Frotscher M. 1990. The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryol (Berl)* 181:413-425.
- Alonso-Nanclares L, Minelli A, Melone M, Edwards RH, Defelipe J, Conti F. 2004. Perisomatic glutamatergic axon terminals: a novel feature of cortical synaptology revealed by vesicular glutamate transporter 1 immunostaining. *Neuroscience* 123:547-556.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A and others. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711.
- Pawelzik H, Hughes DI, Thomson AM. 2002. Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 443:346-367.
- Perrenoud Q, Rossier J, Geoffroy H, Vitalis T, Gallopin T. 2012. Diversity of GABAergic Interneurons in Layer VIa and VIb of Mouse Barrel Cortex. *Cereb Cortex* .
- Ramon y Cajal, S. (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 22.
- Ribak CE, Vaughn JE, Saito K. 1978. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res* 140:315-332.
- Ribak CE, Anderson L. 1980. Ultrastructure of the pyramidal basket cells in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 192:903-916.
- Ribak CE, Seress L. 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577-597.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG. 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14:835-857.
- Ribak CE, Seress L. 1988. A Golgi-electron microscopic study of fusiform neurons in the hilar region of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 271:67-78.
- Ribak CE, Nitsch R, Seress L. 1990. Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 300:449-461.
- Scharfman HE. 1992. Differentiation of rat dentate neurons by morphology and electrophysiology in hippocampal slices: granule cells, spiny hilar cells and aspiny 'fast-spiking' cells. *Epilepsy Res Suppl* 7:93-109.
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Sik A, Penttonen M, Buzsaki G. 1997. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur J Neurosci* 9:573-588.

- Sloviter RS, Nilaver G. 1987. Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol* 256:42-60.
- Sloviter RS. 1989. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280:183-196.
- Soriano E, Frotscher M. 1994. Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus* 4:65-69.
- Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, Gan L. 2009. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 5:624-633.
- Szabadics J, Soltesz I. 2009. Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci* 29:4239-4251.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Tamas G, Buhl EH, Somogyi P. 1997. Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 500 (Pt 3):715-738.
- Tricoire L, Pelkey KA, Daw MI, Sousa VH, Miyoshi G, Jeffries B, Cauli B, Fishell G, McBain CJ. 2010. Common origins of hippocampal Ivy and nitric oxide synthase expressing neurogliaform cells. *J Neurosci* 30:2165-2176.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. 2011. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci* 31:10948-10970.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919-5924.
- Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. 2007. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 27:6771-6780.
- Vucurovic K, Gallopin T, Ferezou I, Rancillac A, Chameau P, van Hooft JA, Geoffroy H, Monyer H, Rossier J, Vitalis T. 2010. Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations. *Cereb Cortex* 20:2333-2347.
- Wenzel HJ, Buckmaster PS, Anderson NL, Wenzel ME, Schwartzkroin PA. 1997. Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 7:559-570.

Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y. 1989. Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 280:254-271.

Zander JF, Munster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gomez-Lira G, Heinemann U, Gutierrez R, Laube G, Hnert-Hilger G. 2010. Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30:7634-7645.

c. Conclusions et perspectives de l'article 1

Plusieurs études se sont intéressées aux neurones du hilus. Initialement ces classifications étaient basées sur des caractéristiques morphologiques telles que la localisation du soma et la projection axonale (Freund and Buzsaki, 1996; Han et al, 1993; Halasy and Somogyi, 1993). Puis les neurones du hilus ont également été décrits par leurs marqueurs neurochimiques et leur comportement électrophysiologique (Freund and Buzsaki, 1996; Acsady et al., 2000; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Houser, 2007; Jinno and Kosaka, 2002; Lubke et al., 1998). Cependant il est difficile d'établir des corrélations entre ces différentes classifications à cause de la diversité des paramètres étudiés et pris en compte (Mott et al., 1997; Parra et al., 1998). En combinant des enregistrements en patch-clamp sur tranches de gyrus denté, suivis de scRT-PCR et d'injection de biocytine, nous avons pu réaliser une classification des neurones du hilus détaillant leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques.

Une analyse non supervisée en clusters nous a permis de mettre en évidence une nette séparation entre les cellules glutamatergiques et GABAergiques, caractérisées par la transcription de VGluT1 et de la GAD respectivement. Au sein des neurones GABAergiques, trois populations ont émergé. Les classes 1 et 2 sont caractérisées par l'expression des mêmes marqueurs neurochimiques, NPY et SOM, mais elles se différencient par leurs propriétés électrophysiologiques. La classe 3 est composée de neurones exprimant soit la PV soit la NOS1.

Les cellules glutamatergiques mises en évidence correspondent vraisemblablement aux cellules moussues, au vu de leur comportement électrophysiologique particulier (Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Lubke et al., 1998; Henze and Buzsaki, 2007), de leur expression systématique de l'ARNm de VGluT1 sans expression de celui de la GAD (Soriano and Frotscher, 1994; Wenzel et al., 1997; Fujise et al., 1998), et de l'expression de l'ARNm de la CR sans expression d'ARNm de marqueurs classiques d'interneurones inhibiteurs. En outre, la

morphologie de ces cellules multipolaires couvertes d'excroissances épineuses coïncide tout à fait avec celle des cellules moussues (Amaral, 1978; Freund and Buzsaki, 1996; review Henze and Buzsaki, 2007; Frotscher et al., 1991).

En ce qui concerne les clusters d'interneurones GABAergiques, nous proposons des rapprochements avec des classes d'interneurones décrites dans différentes études au vu de leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques. Toutefois il faut noter qu'en raison de contraintes techniques nous n'avons pas pu obtenir de marquage des axones. En effet la technique de RT-PCR sur cellule unique nécessite l'aspiration d'une partie du cytoplasme de la cellule et ne permet donc pas une diffusion optimale du traceur neuronal injecté. Par ailleurs l'âge adulte des animaux a été une difficulté supplémentaire. Classiquement, les études d'électrophysiologie combinées à des analyses morphologiques se font sur des rongeurs âgés de 14 à 18 jours pour une meilleure survie des tranches, or nous avons travaillé avec des souris âgées de deux à trois mois. Nous avons d'ailleurs vérifié qu'en réalisant les mêmes expériences sur des souris âgées de 18 jours, l'arborisation axonale était parfaitement visible. Une révélation complète des plexus axonaux serait évidemment un atout pour confirmer les hypothèses décrites ci-après.

Parmi les neurones GABAergiques, la classe 1 se distingue par une forte expression du NPY et de la SOM, des potentiels d'action de courte durée, une forte adaptation de fréquence et d'amplitude et un léger courant rectificateur en réponse à une hyperpolarisation. Par ailleurs les soma des neurones de la classe 1 sont localisés dans toute la profondeur du hilus et leur arbre dendritique reste confiné au hilus. Toutes ces caractéristiques laissent à penser que les neurones de la classe 1 correspondent à des HIPP cells (Scharfman, 1992; Mott et al., 1997; Lubke et al., 1998; Sik et al., 1997 ; Bakst et al., 1986; Katona et al., 1999; Freund and Buzsaki, 1996; review Tallent, 2007; review Houser, 2007; Sik et al, 1997; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; Katona et al., 1999).

Quant aux neurones de la classe 2, ceux-ci expriment également fortement la SOM et le NPY. Cependant ils se démarquent de la classe 1 par leur comportement électrophysiologique : leur résistance membranaire et leur constante de temps sont plus élevées, et leur rhéobase est faible. Morphologiquement, ces neurones sont fusiformes et déploient une arborisation dendritique bipolaire qui peut atteindre la couche moléculaire. Ils pourraient correspondre à des interneurons fusiformes exprimant la SOM (Bakst et al., 1986; Ribak and Seress, 1988; Milner and Bacon, 1989; Deller and Leranath, 1990; Leranath et al., 1990; Buckmaster and Schwartzkroin, 1995; review Ribak and Shapiro, 2007).

En plus des neurones exprimant fortement le NPY et la SOM, une autre classe de neurones a émergé de notre analyse, la classe 3. Cette classe a ensuite été sous-divisée en classe 3.1 et classe 3.2 sur la base des propriétés moléculaires des neurones. La classe 3.1 est composée de neurones exprimant tous la PV. Par ailleurs ces neurones présentent un comportement électrophysiologique typique des cellules « fast spiking », c'est-à-dire qu'ils sont capables d'émettre des potentiels d'action à très haute fréquence, qu'ils ont une résistance membranaire et une constante de temps faibles, et qu'ils ne présentent pas de courant rectificateur en réponse à des pas de courant hyperpolarisants. D'un point de vue morphologique les soma des neurones de la classe 3.1 se situent dans la zone sous-granulaire. Les neurones de la classe 3.1 semblent ainsi s'apparenter à des cellules en panier ou axoaxoniques à décharge rapide et exprimant la PV, de par leurs propriétés électrophysiologiques (Kawaguchi et al., 1987; Pawelzik et al., 2002; Freund, 2003; Lubke et al., 1998; Szabadics and Soltesz, 2009; Tricoire et al., 2011; Zhang and Buckmaster, 2009), moléculaires (Ribak et al., 1990; Freund and Buzsaki, 1996; Kosaka et al., 1987; Katsumaru et al., 1988; Sloviter, 1989; Celio, 1990; Nitsch et al., 1990; Gulyas et al., 1991), et morphologiques (Freund and Buzsaki, 1996; Kosaka et al., 1987; Nitsch et al., 1990; Ribak et al., 1990; Ribak and Seress, 1983; Ribak and Anderson, 1980).

Les neurones de la classe 3.2 présentent des caractéristiques électrophysiologiques assez similaires aux neurones de la classe 3.1, avec toutefois une fréquence de décharge un peu moins élevée, une résistance membranaire et une constante de temps plus grandes, des potentiels d'action plus longs. Les neurones de la classe 3.2 expriment fréquemment la NOS1, ainsi que le NPY. Ces neurones pourraient être des cellules neurogliaformes ou des « ivy cells » (Fuentelba et al., 2008; Szabadics and Soltesz, 2009; Tricoire et al., 2010; Markwardt et al., 2011). Nous suggérons que ces cellules neurogliaformes pourraient être un type de neurones HICAP. En effet, les cellules neurogliaformes ont un plexus axonal dense localisé autour de leur corps cellulaire et innervant les cellules granulaires (Markwardt et al., 2010). De même que pour les cellules HICAP, leur soma est situé dans la zone sous-grulaire du hilus, et leur axone innerve principalement le tiers inférieur de la couche moléculaire ainsi que la couche granulaire (Sik et al., 1997; Freund and Buszaki, 1996). En outre l'expression de la NOS1 est une des caractéristiques des cellules HICAP (Freund and Buszaki, 1996), tout comme les AHPs de grande amplitude et les potentiels d'action de courte durée (Sik et al., 1997; Szabadics and Soltesz, 2009). Par ailleurs, plusieurs études ont décrit un groupe de neurones ressemblant aux cellules exprimant la PV, qui n'expriment pas la SOM, ont une forme pyramidale et un soma localisé dans la région sous-grulaire (Freund and Buzsaki, 1996; Kohler et al., 1987; Deller and Leranth, 1990). En innervant les cellules granulaires nouvellement générées, les cellules neurogliaformes participent à leur maturation et coordonnent l'activité dans la niche neurogénique (Markwardt et al., 2010). L'étude plus approfondie de cette population neuronale pourrait améliorer notre compréhension des déficits de neurogénèse observés dans des neuropathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Jinno and Kosaka; 2004; Boekhoorn et al., 2006; Verret et al., 2007; Palop et al., 2007; Sun et al., 2009).

2. Article 2

a. Présentation de l'article 2

Chez les mammifères, le cerveau continue à produire de nouveaux neurones tout au long de la vie (Eriksson et al., 1998). Cette neurogénèse se fait à partir de cellules progénitrices neurales situées dans quelques rares régions du cerveau, incluant la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Kempermann et al., 2004). Les neurones nouvellement générés deviennent progressivement structurellement et fonctionnellement intégrés au circuit neuronal hippocampique, dans lequel ils vont jouer un rôle critique dans certains processus d'apprentissage et de mémoire (Shors et al., 2001 ; Trouche et al., 2009 ; Deng et al., 2010 ; Goodman et al., 2010 ; Pan et al., 2012). Certains auteurs estiment que la diminution drastique de la neurogénèse hippocampique au cours du vieillissement pourrait contribuer au déclin cognitif qui accompagne la sénescence chez l'homme et l'animal (Kuhn et al., 1996 ; Driscoll et al., 2006 ; Drapeau and Abrous, 2008). Ainsi, la possibilité de stimuler la prolifération de ce réservoir de cellules souches neurales endogènes pourrait être mis à profit à des fins thérapeutiques pour améliorer les conditions du vieillissement (Lindvall and Kokaia, 2006 ; Kiyota et al., 2011).

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui entraîne de sévères déficiences cognitives. C'est l'une des causes les plus répandues de démence chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. La maladie d'Alzheimer se caractérise par la dégénérescence précoce des projections neuronales cholinergiques du noyau basal du néocortex (Whitehouse et al., 1981). Les traitements disponibles visent donc essentiellement à améliorer la transmission synaptique cholinergique. Le taux d'acétylcholine (neurotransmetteur impliqué dans la mémorisation) diminuant progressivement au cours de la maladie, les médicaments vont agir sur l'enzyme qui dégrade l'acétylcholine : la cholinestérase. Les anticholinestérasiques regroupent trois molécules différentes mais de même efficacité : donépézil (Aricept®), galantamine (Reminyl®) et rivastigmine (Exelon®).

L'entourage du patient note généralement une amélioration globale, tant au niveau du comportement que dans les gestes quotidiens. En revanche, il n'y a pas d'amélioration significative en terme de mémoire. La seconde famille de médicament (un seul médicament : la mémantine ; Ebixa®) vise à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. Aucune de ces thérapies ne ralentit l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Mais elles améliorent les conditions de vie du patient et rendent plus confortable la prise en charge par l'entourage. Les nouvelles stratégies comme l'immunothérapie visent désormais à traiter les causes de la maladie.

La prolifération de nouvelles cellules neuronales a été observée dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Jin et al., 2004), mais ne comble visiblement pas les pertes neuronales inhérentes à la maladie d'Alzheimer (Boekhoorn et al., 2006). Le cerveau adulte malade ayant toujours la capacité de générer de nouvelles cellules, nous avons voulu examiner s'il est possible d'induire la différenciation neuronale et d'améliorer la survie des nouveaux neurones.

Nous avons mené, en collaboration avec Claire Rampon et Kevin Richetin (Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CRCA, Toulouse), un projet visant à stimuler la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe de souris. Pour ce faire, la surexpression de NeuroD1 (Neurogenic Differentiation 1) a été induite dans des progéniteurs en division dans le gyrus denté de l'hippocampe.

NeuroD1 est un facteur de transcription proneural à domaine hélice-boucle-hélice. NeuroD1 est essentiel au développement du système nerveux central, et en particulier pour la génération des cellules granulaires dans l'hippocampe et le cervelet (Miyata et al., 1999 ; Liu et al., 2000) ainsi que pour les cellules périglomérulaires dans le bulbe olfactif (Boutin et al., 2010). Son rôle a été identifié dans diverses espèces allant du xénope à l'homme (Lee et al., 1995 ; Tamimi et al., 1996).

Dans le gyrus denté de l'hippocampe, NeuroD1 est exprimé de manière transitoire par les cellules granulaires en développement (Von Bohlen and Halbach, 2007 ; Pleasure et al., 2000) (figure 26). NeuroD1 n'est pas exprimé dans les cellules souches, caractérisées par l'expression de la GFAP et de la nestine. NeuroD1 est exprimé par environ 20% des cellules progénitrices de type 2a, par plus de 90% des cellules progénitrices de type 2b et par quasiment la totalité des cellules progénitrices de type 3 (voir introduction partie 3.b). L'expression de NeuroD1 coïncide également en partie avec celle de Prox-1 (Prospero homeobox protein 1) qui est un marqueur des cellules granulaires immatures et matures, mais elle est fortement diminuée dans les cellules granulaires matures exprimant NeuN (Gao et al., 2009). NeuroD1 a donc un profil d'expression restreint principalement aux progéniteurs de type 2b, aux neuroblastes ou progéniteurs de type 3 et aux cellules granulaires immatures. Il intervient en phase terminale de la différenciation neuronale.

NeuroD1 est connu pour être impliqué dans la différenciation neuronale des progéniteurs neuronaux. En effet, NeuroD1 est indispensable pour diriger la spécification et la maturation neuronales (Roybon et al., 2009), et favoriser la pousse neuritique et la migration des nouveaux neurones (Ge W. et al., 2006 ; Gaudilliere et al., 2004). NeuroD1 est également essentiel à la survie des cellules granulaires de l'hippocampe (Miyata et al., 1999). Lorsqu'il est surexprimé dans des cellules souches hippocampiques de souris *in utero*, quasiment toutes les nouvelles cellules deviennent des neurones matures (Roybon et al., 2009). Ainsi, NeuroD1 apparait comme une molécule de choix pour stimuler la production de nouveaux neurones dans le cerveau vivant.

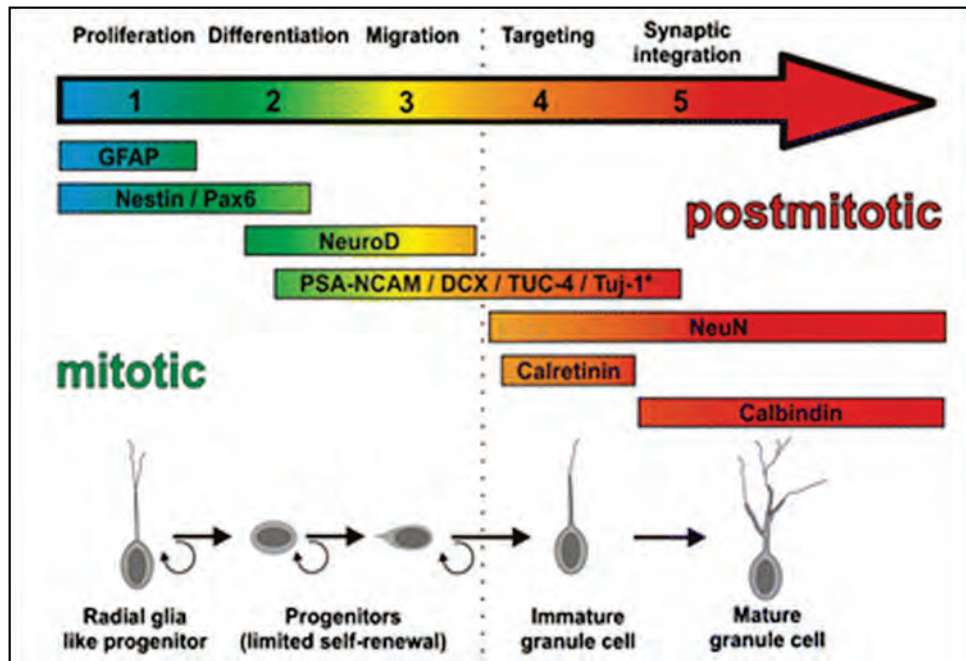


Figure 26 : Différentes étapes de la neurogénèse dans le gyrus denté et expression de marqueurs spécifiques. La genèse de nouveaux neurones dans la couche granulaire peut être divisée en 5 phases de développement. Les cellules souches prolifèrent. Les précurseurs générés prolifèrent (étape 1) et donnent lieu à des cellules amplifiantes, qui vont se différencier en neurones immatures (étape 2). Ces neurones immatures migrent pour atteindre la couche granulaire (étape 3), ils étendent leurs axones vers le CA3 et leurs dendrites vers la couche moléculaire (étape 4). Les nouvelles cellules granulaires sont ensuite intégrées synaptiquement au réseau hippocampique (étape 5). A ces différents stades de développement correspondent des molécules spécifiques exprimées par les nouvelles cellules. D'après Von Bohlen and Halbach, 2007.

Ce projet vise à examiner si la sur-expression de NeuroD1 peut permettre de manipuler *in vivo* les progéniteurs hippocampiques. A court terme, ce genre de stratégie pourrait permettre de compenser les dysfonctionnements neurogéniques liés au vieillissement pathologique et, à plus long terme, de ralentir le déclin cognitif associé au vieillissement pathologique. Afin d'augmenter la neurogenèse hippocampique chez la souris adulte, une stratégie de gain de fonction basée sur l'utilisation d'un vecteur rétroviral ne ciblant que les progéniteurs en division a été développée par nos collaborateurs au CRCA et L. Roybon (Lund University) permettant le transfert de gènes *in vivo*. L'objectif est de surexprimer, de façon stable et durable, le gène NeuroD1 dans les progéniteurs hippocampiques, au sein de leur niche cérébrale, le gyrus denté, chez la souris.

b. Article 2 en préparation: Manipulating hippocampal progenitors to stimulate the production of new neurons in the adult mouse brain

Les résultats obtenus au Centre de Recherches sur la Cognition Animale durant la thèse de Kevin Richetin ont eu pour objectif de caractériser les conséquences cellulaires de la surexpression du facteur de transcription NeuroD1 au sein des progéniteurs hippocampiques, chez la souris adulte. Ma contribution à ce projet a consisté à caractériser au niveau électrophysiologique l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones sur-exprimant NeuroD1. L'article étant en préparation, les résultats obtenus au CRCA ne seront pas montrés mais résumés brièvement.

i. Introduction

Dans l'hippocampe de jeunes rongeurs adultes, la majorité des nouvelles cellules générées va disparaître dans les semaines qui suivent leur naissance (Kempermann et al., 2003). Parmi les cellules qui survivent, environ 70% s'engagent dans une spécification neuronale, suggérant que 30% des nouvelles cellules pourraient potentiellement être manipulées pour donner naissance à un plus grand nombre de neurones. Des études récentes ont montré que NeuroD1 est nécessaire à la survie des neurones hippocampiques et que, après un délai de trois semaines, 99,9% des cellules sur-exprimant NeuroD1 sont différenciées en neurones dans le cerveau de très jeunes souris âgées de deux semaines après injection *in utero* de NeuroD1 (Roybon et al., 2009). Basés sur des approches phénotypiques, et morphométriques, les travaux doctoraux de Kevin Richetin ont mis en évidence que dans le cerveau de souris adulte âgée de 3 mois, la surexpression de NeuroD1 permet 1) de favoriser l'engagement de progéniteurs hippocampiques vers la voie neuronale, 2) d'accélérer la maturation des nouveaux neurones durant les trois premières semaines de leur développement.

Les travaux que j'ai menés à l'ESPCI ont consisté à déterminer par une approche électrophysiologique l'impact de la surexpression de NeuroD1 sur l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones de l'hippocampe. Pour ce faire, nous avons caractérisé la capacité des nouveaux neurones transduits 1) à émettre des potentiels d'action, 2) à répondre à des stimulations de la couche granulaire avant et après l'application d'antagonistes des récepteurs au glutamate et au GABA. Sur la base de la littérature existante, on estime que l'ensemble de ces critères peut nous fournir des informations concernant le niveau de maturité des nouveaux neurones du gyrus denté de l'hippocampe (Esposito et al., 2005 ; Sun et al., 2010). Nous avons examiné ces propriétés chez des nouveaux neurones âgés de 21 et 28 jours car c'est dans cette fenêtre de temps qu'ils deviennent capables d'émettre des potentiels d'action (Mongiat et al., 2009) et de recevoir des afférences GABAergiques et glutamatergiques (Esposito et al., 2005 ; Zhao et al., 2006; Toni et al., 2007; Ge S. et al., 2008). Ainsi, 21 ou 28 jours après l'injection du vecteur viral, les cellules transduites, donc en division au moment de l'injection, expriment la protéine verte fluorescente GFP. Elles peuvent ainsi être visualisées et patchées.

ii. Matériels et Méthodes

Electrophysiologie: Vingt-neuf souris C57BL/6 (Charles River), âgées de 3 à 5 mois ont été anesthésiées par un mélange de kétamine (1%) et de xylazine (1‰) et reçu une perfusion intracardiaque d'une solution glacée (~4°C) de sucrose contenant (en mM) : CaCl₂ (1), glucose (10), KCl (1), MgCl₂ (5), NaHCO₃ (26), sucrose (248). Les souris ont été décapitées et les cerveaux ont été rapidement récupérés et immergés dans la même solution glacée. Ils ont ensuite été placés sur la plateforme d'un vibratome (VT-1200, Leica) et coupés en tranches frontales de 300 µm d'épaisseur. Les tranches ont ensuite été transférées pendant 10 minutes dans une chambre contenant une solution chauffée (~33°C) contenant (en mM): CaCl₂ (2), KCl (2,5), MgCl₂ (3), NaH₂PO₄ (1), NaCl (124), glucose (11); NaHCO₃ (26,2). A chacune de ces étapes les tranches ont été oxygénées en

continu avec du carbogène (95%O₂/5%CO₂) (Air Liquide). Les tranches ont été placées dans une chambre d'enregistrement, posée sur la plateforme d'un microscope BX-51 (Olympus) à contraste interférentiel (Nomarsky), équipé d'une caméra Retiga SRV (QImaging), et visualisées à l'aide du logiciel QCapture (QImaging). La préparation était immergée dans une solution d'aCSF (fluide céphalo-rachidien artificiel) oxygénée continuellement renouvelée (3 ml/min) contenant (en mM): CaCl₂ (3), KCl (2,5), MgCl₂ (1,5), NaH₂PO₄ (1), NaCl (124), glucose (11); NaHCO₃ (26,2). Les pipettes ont été tirées à partir de capillaires de borosilicate et remplies d'une solution contenant (en mM): K-gluconate (120), KCl (20), MgCl₂ (3), HEPES (10), EGTA (0,5), 288mOsm. Les cellules GFP ont été identifiées par microscopie en fluorescence. Les enregistrements en patch-clamp sur cellule entière ont été réalisés avec un amplificateur Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les signaux ont été filtrés à 3 kHz (filter de Bessel; Frequency Devices, Haverhill, MA) et digitalisés à 20 kHz par un convertisseur de signal analogique (Digidata 1322A; Molecular Devices), connecté à un ordinateur équipé du logiciel pClamp 9.2 (Molecular Devices). Afin de décrire le comportement des neurones enregistrés, 4 paramètres électrophysiologiques ont été mesurés en courant imposé. Le potentiel de repos a été mesuré immédiatement après l'accès électrique au compartiment intracellulaire de la cellule. La résistance d'accès (R_m) et la constante de temps membranaire (τ_m) ont été déterminées en réponse à des pas de courant hyperpolarisants induisant une réponse en voltage maximale de -10 à -15 mV (Kawaguchi, 1993). R_m a été mesurée suivant la loi d'Ohm et τ_m a été déterminée comme la constante de temps d'une approximation exponentielle de la réponse en voltage à partir du début de l'hyperpolarisation jusqu'à son maximum. La présence de potentiels d'action a été évaluée par des pas de courant dépolarisant (incrément de 10pA, 800ms). L'amplitude du premier potentiel d'action a été définie à la rhéobase comme la différence entre les potentiels membranaires à son commencement et à son pic. Les potentiels ont été corrigés par un potentiel de jonction liquide calculé de 13,8 mV.

La stimulation extracellulaire (0.1 Hz ; 0,25-1,2 mA ; 50 μs) a été faite à l'aide d'électrodes concentriques bipolaires et d'une unité de stimulation. L'électrode de stimulation a été placée dans

la couche granulaire à $\sim 300 \mu\text{m}$ de la cellule enregistrée. Les courants post-synaptiques évoqués ont été enregistrés en voltage imposé à partir d'un potentiel de -80 mV ($E_{\text{Cl}} = +41 \text{ mV}$ dans ces conditions expérimentales, figure 1). Un neurone est considéré silencieux lorsqu'il ne répond pas à une stimulation de $1,2 \text{ mA}$ mais qu'une cellule granulaire contrôle adjacente répond. Les réponses sont moyennées sur au moins cinq mesures. Pour le blocage des courants glutamatergiques, de l'acide kynurénique (2 mM) a été ajouté à la solution extracellulaire. Les réponses évoquées suite à des stimulations extracellulaires ont été mesurées après un délai de 10 minutes. Pour le blocage des courants glutamatergique et GABAergique, de l'acide kynurénique (2 mM) et de la bicuculline ($20 \mu\text{M}$) ont été ajoutés à la solution extracellulaire. Les réponses évoquées suite à des stimulations extracellulaires ont été mesurées après un délai de 5 minutes.

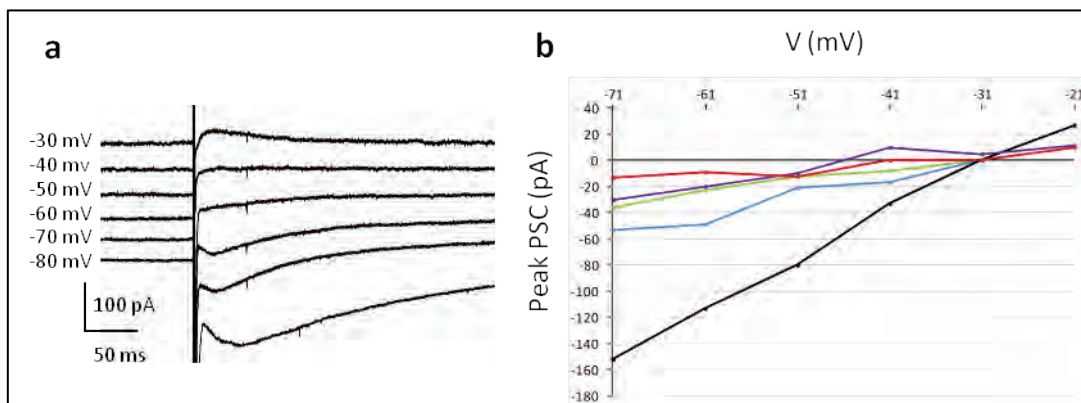


Figure 1 : *a. Exemple de courants post-synaptiques (PSCs) GABAergiques évoqués, enregistrés sur un neurone de 28j à un potentiel de maintien indiqué à gauche. b. Courbe I-V du pic des PSCs GABAergiques obtenus après application d'acide kynurénique (2 mM). ($n=5$ cellules). En accord avec une forte perméabilité des récepteurs GABA_A au Cl (Kaila, 1994), les PSCs GABAergiques évoqués indiquent un potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}) de -31 mV , qui, après correction d'un potentiel de jonction de l'électrode de $13,8 \text{ mV}$, est proche du potentiel d'équilibre du Cl (E_{Cl}) de -41 mV prévu dans nos conditions expérimentales d'enregistrement en cellule entière.*

iii. Résultats

Les nouveaux neurones peuvent générer des potentiels d'action en réponse à un courant dépolarisant à partir de l'âge de 20 jours environ (Mongiat et al., 2009). Récemment, les connections synaptiques des nouveaux neurones vers d'autres cellules ont été mises en évidence structurellement et fonctionnellement (Toni et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que des connections synaptiques afférentes fonctionnelles émergent de la voie perforante autour de la troisième semaine de maturation (Esposito et al., 2005 ; Zhao et al., 2006 ; Toni et al., 2007 ; Ge S. et al., 2008). Pour être fonctionnelle, une nouvelle cellule granulaire doit être capable de générer des potentiels d'action mais doit également intégrer les afférences excitatrices et inhibitrices, et libérer des neurotransmetteurs vers les neurones post-synaptiques. Afin d'évaluer le niveau d'intégration des neurones sur-exprimant NeuroD1 au sein du réseau hippocampique, des enregistrements en patch-clamp ont été réalisés sur des nouveaux neurones contrôles exprimant la GFP seule (cellules GFP+) ainsi que sur des nouveaux neurones sur-exprimant NeuroD1 et GFP, à des délais de 21 et 28 jours post injection (jpi).

A 21 jpi, les neurones sur-exprimant NeuroD1 ont montré une plus grande capacité à émettre des potentiels d'action en réponse à des injections de courant (figure 2a). En effet, le nombre maximal de potentiels d'action générés lors d'un pas de courant est de 1.8 ± 0.6 pour les neurones GFP+ contrôles et de 6.8 ± 1.7 pour les neurones GFP+ sur-exprimant NeuroD1 (figure 2b). A 21 jpi, 7 des 18 cellules GFP+ contrôles n'ont pas été capables de générer de potentiel d'action, incluant 6 cellules montrant des propriétés typiques des cellules gliales (figure 3), tandis que toutes les cellules GFP+ sur-exprimant NeuroD1 ont pu émettre des potentiels d'action. Les résultats obtenus pour les cellules contrôles sont en accord avec une étude récente (Mongiat et al., 2009) qui montre que la capacité des nouveaux neurones à générer plusieurs potentiels d'action n'intervient qu'entre 24 et 28 jours.

En outre, une stimulation extracellulaire de la couche granulaire a induit des courants post-synaptiques (PSCs) évoqués dans 37,5% des cellules GFP+ contrôles alors qu'une plus forte proportion de neurones a répondu à la stimulation quand NeuroD1 était sur-exprimé (94%) (figure

2c). Tous les PSCs détectés à 21 jpi ont été partiellement bloqués par de l'acide kynurénique (2 mM), un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate, et complètement bloqués lorsque l'acide kynurénique a été appliqué conjointement avec la bicuculline (20 μ M), un antagoniste spécifique des récepteurs GABA_A (figure d). Nos résultats pour les neurones contrôles GFP+ vont dans le sens de ceux de Mongiat et al (2009), montrant que les neurones âgés de 19 jours ne répondent que très faiblement à une stimulation de la voie perforante. Par ailleurs, plusieurs études indiquent que peu de neurones reçoivent des afférences GABAergiques et glutamatergiques fonctionnelles avant trois semaines (Esposito et al., 2005 ; Toni et al., 2007 ; Ge S. et al., 2008), et qu'à cet âge, la densité d'épines dendritiques des nouveaux neurones reste faible (Zhao et al., 2006). Nos données suggèrent que les neurones sur-exprimant NeuroD1 disposent d'une plus grande maturité fonctionnelle et d'une meilleure intégration dans le réseau que les neurones contrôles GFP+, et qu'ils reçoivent plus d'afférences GABAergiques et glutamatergiques fonctionnelles.

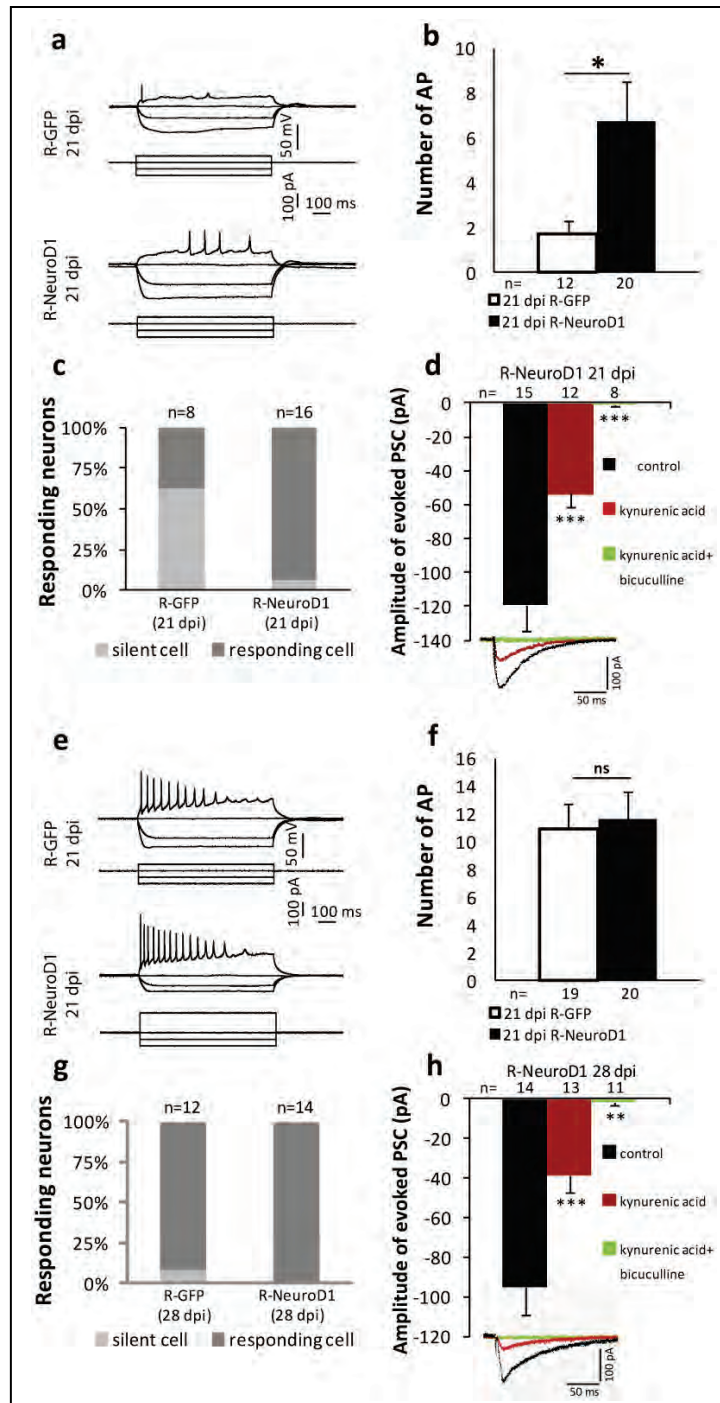


Figure 2: Comportement électrophysiologique des nouveaux neurones à 21 et 28 dpi. **a. (e)** Exemple de comportement électrophysiologique à 21 dpi (28 dpi) d'un neurone contrôle GFP+ (traces du haut) et d'un neurone GFP+ sur-exprimant NeuroD1. Les réponses en voltage sont induites par des injections de courant : -100 à 0 pA par incréments de 50 pA et 50 pA. **b. (f)** Nombre maximal de potentiels d'action générés durant un pas de courant. Moyenne \pm SEM. Les valeurs P ont été calculées avec un test t. **c. (g)** Pourcentage de neurones GFP+ répondant à une stimulation électrique extracellulaire de la couche granulaire. Un neurone est considéré silencieux quand il ne répond pas à une stimulation de 1.2 mA mais qu'une cellule granulaire adjacente GFP- répond. **d. (h)** Amplitude des PSCs évoqués dans les neurones sur-exprimant NeuroD1 à 21 dpi (28 dpi) par une stimulation extracellulaire de la couche granulaire (pA). Moyenne \pm SEM. Les valeurs P ont été calculées avec un test t apparié. Les traces du bas illustrent des exemples de PSCs évoqués dans des conditions standards (noir), après application d'acide kynurénique (rouge), et après application conjointe d'acide kynurénique et de bicuculline (vert).

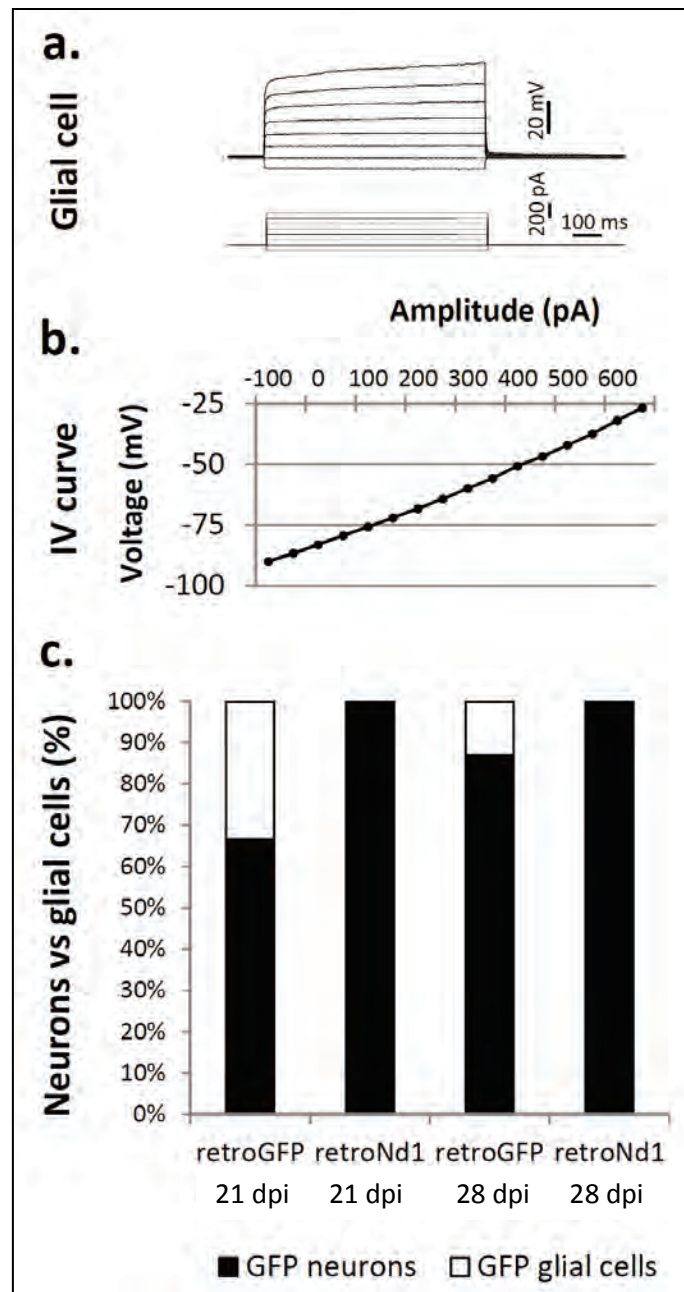


Figure 3: Comportement électrophysiologique des cellules gliales et occurrence des cellules gliales à 21 et 28 jpi. *a.* Comportement électrophysiologique d'une cellule gliale à 21 jpi. Les réponses en voltage sont induites par des injections de courant : -100 à 600 pA par incréments de 100 pA. *b.* La courbe linéaire IV de cette cellule est caractéristique des cellules gliales. *c.* Pourcentage de neurones et de cellules gliales parmi les neurones GFP+. A 21 jpi et 28 jpi toutes les cellules sur-exprimant NeuroD1 sont des neurones, tandis que dans les groupes contrôles, 33% des cellules GFP+ à 21 jpi et 13% à 28 jpi montrent un comportement électrophysiologique typique des cellules gliales.

Une semaine plus tard, à 28 jpi, la capacité à émettre des potentiels d'action en réponse à une dépolarisation de la cellule est la même dans les deux groupes de nouvelles cellules (figure 2e). Le nombre maximal de potentiels d'action générés durant un pas de courant est de 11.0 ± 1.8 pour les neurones contrôles GFP+ et de 11.6 ± 2.0 pour les neurones GFP+ sur-exprimant NeuroD1 (figure f) et la différence n'est pas significative. A 28 jpi, seules 4 des 19 cellules contrôles GFP+ n'ont pas généré de potentiel d'action, incluant 3 cellules ayant des propriétés typiques de cellules gliales (figure 3). Nos résultats sont proches de ceux de Mongiat et al (2009), qui indiquent que le nombre maximal de potentiels d'action générés à 28 jours est d'environ 8. Toutes les cellules GFP+ sur-exprimant NeuroD1 ont, quant à elles, été capables d'émettre des potentiels d'action. Par ailleurs, toutes les cellules GFP+ sur-exprimant NeuroD1 ont répondu à une stimulation de la couche granulaire, contre 92% pour les cellules contrôles GFP+ (figure 2g). Tous les PSCs détectés à 28 jpi ont été partiellement bloqués par de l'acide kynurénique, et complètement bloqués par l'application conjointe d'acide kynurénique et de bicuculline (figure 2h). Ces résultats sont en accord avec d'autres études, qui montrent qu'à partir de quatre semaines, la plupart des nouveaux neurones reçoivent des connections synaptiques GABAergiques et glutamatergiques fonctionnelles (Esposito et al., 2005 ; Toni et al., 2007 ; Ge S. et al., 2008).

L'ensemble des résultats suggère que la sur-expression de NeuroD1 mène à une acquisition plus rapide du phénotype de neurones matures et fonctionnels par les nouveaux neurones, cette accélération de la maturation étant visible dès 21 jpi. Néanmoins, à des délais plus longs (28 jpi), les neurones contrôles GFP+ et les neurones GFP+ sur-exprimant NeuroD1 ont atteint une certaine maturité fonctionnelle et expriment des propriétés électrophysiologiques similaires.

c. Conclusions et perspectives de l'article 2

Les travaux réalisés au CRCA ont mis en évidence que la surexpression de NeuroD1 conduit à la différenciation neuronale des cellules progénitrices et qu'elle accélère leur maturation morphologique. Par ailleurs nous avons démontré que les neurones transduits marqués par la GFP, et surexprimant NeuroD1, possèdent des caractéristiques électrophysiologiques de neurones fonctionnels. Ces neurones NeuroD1-GFP+ sont capables d'émettre des potentiels d'action et de recevoir des afférences GABAergiques et glutamatergiques.

Ces résultats pourraient permettre d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans les pathologies affectant la neurogénèse hippocampique. Dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer par exemple, la survie des nouveaux neurones matures, ainsi que celle des neurones immatures, est fortement diminuée (Verret et al., 2007 ; Haughey et al., 2002 ; Donovan et al., 2006). Ce déclin neurogénique pourrait être lié au milieu cérébral devenu hostile aux nouveaux neurones du fait de dépôts amyloïdes abondants. Une des hypothèses avancées est que les nouveaux neurones se différencient et suivent un processus normal de maturation, mais meurent au terme de ce processus (Verret et al., 2007). Des études menées sur d'autres modèles murins de la maladie d'Alzheimer mettent par ailleurs en avant le fait qu'une augmentation du nombre d'astrocytes dans l'hippocampe pourrait contribuer à la perturbation du fonctionnement du réseau hippocampique (Verkhratsky et al., 2010). Une atrophie généralisée des astrocytes serait caractéristique des stades précoces de la maladie. A des stades plus tardifs, au contraire, les astrocytes seraient fortement activés et libéreraient des substances neurotoxiques et inflammatoires qui induiraient la mort des nouveaux neurones.

Dans le futur, ce travail pourrait être poursuivi en examinant si la surexpression de NeuroD1 pourrait être utilisée *in vivo* chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, les souris APP/PS1 chez lesquelles une altération de la neurogénèse a été décrite (Verret et al 2007), présentent l'avantage de modéliser deux étapes de la progression de la maladie : les souris APP

développent une pathologie amyloïde tardive (Borchelt et al., 1997) alors que la co-expression avec une forme mutée de la PS1 accélère l'apparition de la pathologie amyloïde (Jankowsky et al., 2004). La surexpression de NeuroD1 dans l'hippocampe de ces souris permettrait de stimuler l'engagement des nouvelles cellules dans une voie de différenciation neuronale afin d'augmenter la proportion de neurones par rapport aux astrocytes. En outre, elle aiderait à la maturation des nouveaux neurones et pourrait augmenter leurs chances de survie. Les cellules transduites pourraient être analysées à différents délais au niveau moléculaire, pour voir si elles expriment des marqueurs de neurones matures, et au niveau morphologique. Enfin, des tests comportementaux de navigation spatiale et de mémoire pourraient être réalisés afin d'évaluer si la stimulation de la neurogénèse hippocampique permet de combler les déficits cognitifs observés chez ces souris APP/PS1.

III DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le hilus du gyrus denté de l'hippocampe, les cellules mossues excitatrices et les interneurons GABAergiques envoient des informations en « feedback » ou « feedforward » aux cellules granulaires et constituent ainsi des acteurs clés du réseau. Cependant, en raison en partie de leur grande diversité, la fonction des interneurons GABAergiques du hilus dans la physiologie du gyrus denté reste peu détaillée. Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de caractériser les populations neuronales qui composent le hilus afin, par la suite, de contribuer à éclaircir leurs rôles spécifiques.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la localisation et la répartition dans le hilus des interneurons GABAergiques par rapport aux neurones glutamatergiques. Pour ce faire nous avons utilisé des souris transgéniques GAD_{67} -GFP et évalué les densités de neurones exprimant la GFP parmi la population neuronale totale visualisée grâce à des immunomarquages de NeuN (Neuronal Nuclei Antigen). D'autres immunomarquages nous ont permis de mesurer dans le hilus et la couche granulaire du gyrus denté les densités de marqueurs classiques d'interneurons : Calretinine (CR), Parvalbumine (PV), Somatostatine (SOM), Neuropeptide Y (NPY), Oxyde Nitrique Synthétase 1 (NOS1) et Peptide Vasoactif Intestinal (VIP). En outre, pour compléter cette caractérisation des interneurons, leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques ont été étudiées individuellement. La technique utilisée a été la RT-PCR en multiplex sur neurone unique après enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp et injection de biocytine chez des souris C57Bl6 âgées de 2 à 3 mois. Les marqueurs analysés par RT-PCR sont identiques à ceux étudiés en immunomarquages. Une analyse non supervisée en clusters, prenant en compte les paramètres électrophysiologiques et moléculaires, a fait ressortir la prééminence de deux grands types cellulaires : les neurones glutamatergiques vs les interneurons GABAergiques, ces derniers se divisant par la suite en trois clusters. Les deux premiers comprennent des neurones qui expriment le NPY et la SOM mais se distinguent par leurs propriétés électrophysiologiques. Le troisième cluster est composé de neurones à décharge rapide exprimant la PV et de neurones exprimant la NOS-1.

En apportant une description exhaustive des propriétés des interneurones du hilus du gyrus denté chez la souris adulte, cette étude servira de base pour de futurs travaux s'intéressant à leur rôle physiologique au sein du réseau hippocampique. En effet, à la suite de notre classification des interneurones du hilus, il sera alors plus abordable d'étudier leurs rôles respectifs dans la maturation et la survie des neurones nouvellement générés, ou leur implication dans différentes conditions pathophysiologiques.

En parallèle nous avons mené, en collaboration avec Claire Rampon (Centre de Recherches sur la Cognition Animale), un projet visant à stimuler la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe de souris. Pour cela des souris ont reçu une injection intra-hippocampique d'un rétrovirus dirigeant l'expression de eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) et du facteur de transcription proneural NeuroD1. Les résultats obtenus au CRCA sur ce projet montrent que la transduction de ce rétrovirus dans les nouvelles cellules de l'hippocampe conduit à leur maturation en neurone, et accélère leur développement morphologique. Il était primordial de vérifier que les neurones transduits marqués par la GFP, et sur-exprimant NeuroD1, possèdent des caractéristiques électrophysiologiques de neurones fonctionnels. Nous avons montré que ces neurones NeuroD1-GFP+ sont capables d'émettre des potentiels d'action, et ce plus précocement que des neurones ne sur-exprimant pas NeuroD1, et de recevoir des afférences GABAergiques et glutamatergiques. Les neurones NeuroD1-GFP+ sont donc fonctionnels et bien intégrés au réseau hippocampique. Ces avancées pourraient permettre d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans les pathologies affectant la neurogénèse hippocampique.

Les interneurones du hilus pourraient d'ailleurs être impliqués dans ces altérations de la neurogénèse hippocampique. En effet, ils jouent un rôle majeur dans plusieurs étapes de la neurogénèse. Une étude récente a montré que les interneurones du hilus exprimant la PV contrôlent l'activité ou la quiescence des cellules souches neurales de l'hippocampe en fonction de l'activité du réseau (Song et al., 2012). Une autre étude a montré que les cellules nouvellement générées et

engagées dans la voie de différenciation neuronale reçoivent des afférences des cellules ivy/neurogliaformes, celles-ci contrôlant ainsi l'activité GABAergique dans la niche neurogénique (Markwardt et al., 2011).

Par ailleurs, la grande vulnérabilité des interneurons du gyrus denté a été mise en avant dans diverses conditions pathophysiologiques comme l'épilepsie (Magloczky and Freund, 1993 ; Magloczky et al., 2000 ; Andre et al., 2001), l'ischémie (Schmidt-Kastner and Freund, 1991), la maladie d'Alzheimer (Takahashi et al., 2010 ; Andrews-Zwilling et al., 2010), le stress chronique (Czeh et al., 2005 ; Seidel et al., 2008), la schizophrénie (Knable et al., 2004) ou encore le traumatisme crânien (Lowenstein et al., 1992). Les altérations des interneurons du hilus dans ces différentes conditions, que ce soit au niveau de leur morphologie, leur fonctionnalité, leur survie, leur expression de molécules, pourraient avoir un impact sur la fonctionnalité du réseau hippocampique.

Bien que les interneurons du gyrus denté semblent être atteints dans de nombreuses pathologies, je me concentrerai principalement dans la suite de cette discussion à leurs implication dans la maladie d'Alzheimer. Au cours de cette maladie, il a été montré que la maturation et la survie des nouveaux neurones générés dans le cerveau adulte sont fortement perturbées chez l'humain (Jin et al., 2004 ; Boekhoorn et al., 2006) et dans des modèles murins comme les souris transgéniques APP (Haughey et al., 2002 ; Donovan et al., 2006) ou APP/PS1 (Verret et al., 2007 ; Faure et al., 2011 ; Cotel et al., 2012). De récentes études indiquent que cette altération de la neurogénèse impliquerait un déséquilibre des afférences glutamatergiques et GABAergiques vers les nouveaux neurones. En effet, Sun et al ont montré, dans des modèles murins de la maladie, qu'une stimulation GABAergique excessive des nouveaux neurones conduit dans un premier temps à une accélération de leur maturation, puis dans un second temps à une altération de leurs développement morphologique et fonctionnel (Sun et al., 2009). Aux stades précoces du développement des neurones, le GABA a une action dépolarisante et son action provoque un afflux de calcium, ce qui favorise le développement des neurones (Ben-Ari et al., 2002 ; Markwardt and Overstreet-Wadiche, 2008). A l'inverse, aux

stades plus tardifs, le GABA devient hyperpolarisant et les entrées de calcium sont réduites, freinant la maturation. Ce déséquilibre de la balance excitation/inhibition des nouveaux neurones proviendrait d'une sur-activation du réseau excitateur du gyrus denté, associée à des mécanismes compensatoires de remodelage des circuits inhibiteurs (Palop et al., 2007). Les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer sont d'ailleurs plus susceptibles de développer une activité épileptique (Amatniek et al., 2006 ; Lozsadi and Larner, 2006). Palop et al décrivent notamment une germination excessive des fibres NPY dans la couche moléculaire, émanant vraisemblablement d'interneurones GABAergiques du hilus exprimant le NPY et la SOM (Vezzani et al., 1999 ; Palop et al., 2007). Les cellules ivy/neurogliaformes pourraient également être impliquées car elles sont connectées aux nouveaux neurones et coordonnent l'activité GABAergique dans la niche neurogénique (Markwardt et al., 2011).

Par ailleurs, de nombreuses études se sont penchées sur les pertes ou les altérations neuronales observées dans le gyrus denté de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de souris modèles de la maladie. Ces pertes neuronales sont plus conséquentes que celles observées au cours du vieillissement normal et réparties de manière inégale entre les différentes régions qui composent la formation hippocampique. Dans le hilus notamment, la maladie d'Alzheimer induirait la perte de 25% des neurones, alors que le vieillissement normal n'entraîne que peu ou pas de mort neuronale chez l'homme (West et al., 1994 ; Simic et al., 1997). Cependant, toutes les populations neuronales qui peuplent le hilus ne sont pas atteintes de la même manière dans la maladie d'Alzheimer. Les neurones exprimant le NPY et la SOM, et qui constituent la population interneuronale prépondérante du hilus, sont par exemple particulièrement affectés. En effet, de fortes diminutions du nombre de ces neurones ont été enregistrées dans l'hippocampe, et en particulier dans le gyrus denté, de souris transgéniques modèles de la maladie (Ramos et al., 2006 ; Loreth et al., 2012), et précèdent les pertes neuronales des cellules pyramidales. Les mêmes pertes ont été constatées chez des patients post-mortem (Chan-Palay et al., 1986 ; Chan-Palay et al., 1987). En outre, ces cellules présentent une capacité moindre à exprimer l'ARNm de la SOM : son expression mesurée post-

mortem par hybridation in situ est inférieure chez des patients Alzheimer comparée à des sujets contrôles (Dournaud et al., 1994).

Cependant, ces neurones ne sont pas les seuls touchés. En effet, il a été proposé qu'un déséquilibre de l'homéostasie du calcium pourrait être un élément central de la pathogénèse dans la maladie d'Alzheimer (LaFerla et al., 2007). De nombreuses équipes se sont ainsi penchées sur l'étude des populations neuronales qui expriment les protéines de liaison au calcium, protéines qui permettent la régulation de la concentration intracellulaire de calcium. Les cellules qui expriment la calrétinine sont, par exemple, particulièrement sensibles. Une perte importante de ces neurones dans le hilus a été observée chez des souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer (Popovi et al., 2008 ; Takahashi et al., 2009 ; Loreth et al., 2012), ce qui concorde avec des observations faites post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie (Takahashi et al., 2009). De plus, leur morphologie est altérée et les fibres immunoréactives pour la calrétinine sont souvent dystrophiques dans le hilus et la couche moléculaire (Brion and Résibois, 1994). En ce qui concerne les cellules en panier ou les cellules axoaxoniques qui expriment la PV, elles semblent également affectées par la maladie d'Alzheimer. Une diminution significative du nombre de neurones immunomarqués pour la PV a été observée dans l'hippocampe et notamment dans le gyrus denté chez des patients post-mortem (Brady and Mufson, 1997) et chez des souris transgéniques modèles de la maladie (Popovi et al., 2008 ; Loreth et al., 2012). En outre, le dysfonctionnement de ces cellules en panier ou axoaxoniques participerait à la perturbation des rythmes oscillatoires de l'hippocampe, à la trop forte synchronisation du réseau et aux déficits mnésiques (Verret et al., 2012). Enfin des études font part d'une diminution de l'immunoréactivité pour la calbindine dans le gyrus denté de patients (Palop et al., 2003) ou chez des souris transgéniques (Palop et al., 2003 ; Popovi et al., 2008).

Perspectives

- Certaines populations d'interneurones du hilus semblent donc particulièrement affectées dans la maladie d'Alzheimer, que ce soit au niveau de leur survie, de leur morphologie, de leur connectivité et de l'expression de marqueurs moléculaires. Ces évidences ont motivé l'intérêt primordial d'établir une caractérisation claire des interneurones du gyrus denté. Ce pré-requis nous a semblé nécessaire à la compréhension de leurs rôles fonctionnels. La classification multiparamétrique des neurones du hilus chez des souris sauvages que j'ai réalisée au cours de ma thèse servira de base pour déterminer les modifications fonctionnelles du réseau du gyrus denté chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer. L'étape suivante sera alors de déterminer chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer si cette classification neuronale est conservée ou modifiée. Les éventuelles différences dans la répartition des types cellulaires ainsi que les changements de propriétés des neurones pourraient ainsi être évalués en comparant les deux groupes d'animaux malades ou non. L'hyper-activation des afférences GABAergiques semble être prépondérante dans l'altération de la neurogénèse hippocampique dans les modèles d'animaux Alzheimer (Palop et al., 2005 ; Sun et al., 2009). Par conséquent, il serait pertinent de caractériser les activités synaptiques spontanées excitatrice et inhibitrice pour chaque type d'interneurone GABAergique chez des souris contrôles et modèles de la maladie d'Alzheimer. Bien que fastidieuses, ces études permettraient de mieux comprendre les raisons du déséquilibre de la balance excitation/inhibition au sein du gyrus denté.
- Une modification de la connectivité des interneurones pourrait vraisemblablement avoir une incidence sur leur structure morphologique et de ce fait ne doit pas être négligée. En réalisant une caractérisation morphométrique des interneurones (soma, dendrites, épines) du hilus chez des souris sauvages et des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, nous pourrions alors mettre en évidence une forme de plasticité structurale des interneurones.

- Par ailleurs, une étude récente s'est intéressée à l'activité calcique des neurones corticaux de la couche 2/3 chez des souris APP/PS45 modèles de la maladie d'Alzheimer (Busche et al., 2008). Chez ces souris, les neurones proches des plaques amyloïdes sont hyperactifs, avec des transients calciques très fréquents et synchronisés, tandis que les neurones plus éloignés sont hypoactifs ou silencieux. Cette disparité d'activité selon la distance aux plaques amyloïdes est peut-être également présente dans le gyrus denté. Il serait donc judicieux de mesurer pour chaque type d'interneurone, en plus des paramètres cités ci-dessus, leur distance aux plaques amyloïdes.
- Ensuite nous pourrions étudier les modifications d'expression des gènes dans les interneurones. En effet, il a été montré que la couche moléculaire présente une germination excessive des fibres NPY suggérant une sur-expression du neuropeptide mais également de ses récepteurs sur les neurones cibles (Palop et al., 2007). La technique de RT-PCR que nous avons utilisée pour établir la classification ne permet d'obtenir que des données qualitatives de l'expression des gènes. Nous pourrions utiliser la technique de RT-PCR semi-quantitative sur cellule unique afin de déterminer si l'expression du NPY est modifiée chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Cette technique utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence, une mesure de l'amplification en temps réel. Ainsi, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.
- Par ailleurs des immunomarquages ciblant les mêmes marqueurs que ceux que nous avons étudiés précédemment permettraient de comparer le taux d'expression ainsi que la répartition de ces marqueurs dans le hilus chez des souris Alzheimer versus des souris contrôles.

- Enfin nous pourrions étudier plus précisément la connectivité des interneurones avec les nouveaux neurones par des techniques d'optogénétique. En utilisant des lignées de souris PV-cre, NPY-cre, ou NOS1-cre, il serait possible d'exciter spécifiquement certaines populations d'interneurones par infection virale de l'ensemble du hilus et d'enregistrer les réponses éventuelles des nouveaux neurones par la méthode du patch-clamp. Ceux-ci seraient visibles grâce à la stratégie rétrovirale présentée dans le 2nd projet. Ainsi nous pourrions avoir accès aux populations d'interneurones connectées aux neurones générés dans le gyrus denté adulte.

En conclusion, la compréhension des mécanismes à la base de la perturbation de la neurogénèse hippocampique semble être un facteur clé dans la compréhension des étapes de la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi une meilleure connaissance des populations d'interneurones qui peuplent le hilus et de leurs propriétés est indispensable. Les résultats apportés par cette thèse ne représentent qu'une pierre à l'édifice mais constituent néanmoins un pré-requis nécessaire à l'étude plus approfondie du rôle physiologique des interneurones dans le gyrus denté sain et pathologique. Les prochaines études centrées sur le rôle des interneurones du hilus dans la maladie d'Alzheimer seront décisives et permettront de mieux comprendre leur implication dans les altérations de la neurogénèse et du réseau hippocampique.

IV REFERENCES

- Acsady L, Katona I, Martinez-Guijarro FJ, Buzsaki G, Freund TF. 2000. Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J Neurosci* 20:6907-6919.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Amaral DG. 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851-914.
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.
- Amatniek JC, Hauser WA, Castillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, Albert M, Brandt J, Stern Y. 2006. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* 47:867-872.
- American Psychiatric Association .2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition–Text Revision (DSMIV-TR).
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. 1969. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76:4A-5A.
- Andrews-Zwilling Y, Bien-Ly N, Xu Q, Li G, Bernardo A, Yoon SY, Zwilling D, Yan TX, Chen L, Huang Y. 2010. Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J Neurosci* 30:13707-13717.
- Ascoli GA, Atkeson JC. 2005. Incorporating anatomically realistic cellular-level connectivity in neural network models of the rat hippocampus. *Biosystems* 79:173-181.
- Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN. 1999. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav Neurosci* 113:1170-1188.
- Bekenstein JW, Lothman EW. 1993. Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259:97-100.

- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. 1997. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10432-10437.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* 14:764-73, 739.
- Best PJ, White AM. 1999. Placing hippocampal single-unit studies in a historical context. *Hippocampus* 9:346-351.
- Blackstad TW. 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* 105:417-537.
- Blackstad TW. 1958. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat. *Acta Anat (Basel)* 35:202-214.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B. 1970. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 138:433-449.
- Blair HT, Sharp PE. 1996. Visual and vestibular influences on head-direction cells in the anterior thalamus of the rat. *Behav Neurosci* 110:643-660.
- Blasco-Ibanez JM, Freund TF. 1997. Distribution, ultrastructure, and connectivity of calretinin-immunoreactive mossy cells of the mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 7:307-320.
- Blasco-Ibanez JM, Martinez-Guijarro FJ, Freund TF. 2000. Recurrent mossy fibers preferentially innervate parvalbumin-immunoreactive interneurons in the granule cell layer of the rat dentate gyrus. *Neuroreport* 11:3219-3225.
- Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC. 1996. Neurofibrillary pathology--correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 17:909-919.
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM. 1997. Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:414-420.

- Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. 2006. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24:1-14.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van LJ, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.
- Boutin C, Hardt O, de CA, Core N, Goebbels S, Seidenfaden R, Bosio A, Cremer H. 2010. NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1201-1206.
- Brady DR, Mufson EJ. 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience* 80:1113-1125.
- Brazier MA. 1970. Regional activities within the human hippocampus and hippocampal gyrus. *Exp Neurol* 26:254-268.
- Brion JP, Resibois A. 1994. A subset of calretinin-positive neurons are abnormal in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 88:33-43.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Buckmaster PS, Schwartzkroin PA. 1995. Physiological and morphological heterogeneity of dentate gyrus-hilus interneurons in the gerbil hippocampus in vivo. *Eur J Neurosci* 7:1393-1402.
- Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. 1996. Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol* 366:271-292.
- Buckmaster PS, Jongen-Relo AL. 1999. Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurosci* 19:9519-9529.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P. 1994. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. 1995. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5:390-408.
- Burwell RD, Amaral DG. 1998. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398:179-205.

- Burwell RD, Amaral DG. 1998. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391:293-321.
- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321:1686-1689.
- Bussey TJ, Muir JL, Aggleton JP. 1999. Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *J Neurosci* 19:495-502.
- Bussey TJ, Duck J, Muir JL, Aggleton JP. 2000. Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res* 111:187-202.
- Calvin WH, Sypert GW. 1976. Fast and slow pyramidal tract neurons: an intracellular analysis of their contrasting repetitive firing properties in the cat. *J Neurophysiol* 39:420-434.
- Cameron HA, McKay RD. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894-3906.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E. 2000. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6144-6149.
- Chae JH, Stein GH, Lee JE. 2004. NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 18:271-288.
- Chan-Palay V, Lang W, Haesler U, Kohler C, Yasargil G. 1986. Distribution of altered hippocampal neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in Alzheimer's-type dementia. *J Comp Neurol* 248:376-394.
- Chan-Palay V. 1987. Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol* 260:201-223.
- Chevalyere V, Siegelbaum SA. 2010. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* 66:560-572.

- Cohen NJ, Squire LR. 1980. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210:207-210.
- Colombo M, Gross CG. 1994. Responses of inferior temporal cortex and hippocampal neurons during delayed matching to sample in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Behav Neurosci* 108:443-455.
- Colombo M, Fernandez T, Nakamura K, Gross CG. 1998. Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol* 80:1002-1005.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De FJ, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C. 2001. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4:52-62.
- Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O. 2012. Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging* 33:96-107.
- Czeh B, Simon M, van der Hart MG, Schmelting B, Hesselink MB, Fuchs E. 2005. Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology* 30:67-79.
- Dagyte G, Luiten PG, De JT, Gabriel C, Mocaer E, Den Boer JA, Van der Zee EA. 2011. Chronic stress and antidepressant agomelatine induce region-specific changes in synapsin I expression in the rat brain. *J Neurosci Res* 89:1646-1657.
- Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE. 2001. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res* 890:261-271.
- Davies P, Terry RD. 1981. Cortical somatostatin-like immunoreactivity in cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol Aging* 2:9-14.
- De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. 1989. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495:387-395.
- De Hoz L, Knox J, Morris RG. 2003. Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13:587-603.
- Defelipe J. 1993. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3:273-289.

- Defelipe J. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 (Pt 10):1807-1822.
- Deller T, Leranath C. 1990. Synaptic connections of neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the hilar area of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 300:433-447.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Doischer D, Hosp JA, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M. 2008. Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *J Neurosci* 28:12956-12968.
- Dolorfo CL, Amaral DG. 1998. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol* 398:49-82.
- Dolorfo CL, Amaral DG. 1998. Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398:25-48.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. 2006. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
- Dournaud P, Cervera-Pierot P, Hirsch E, Javoy-Agid F, Kordon C, Agid Y, Epelbaum J. 1994. Somatostatin messenger RNA-containing neurons in Alzheimer's disease: an in situ hybridization study in hippocampus, parahippocampal cortex and frontal cortex. *Neuroscience* 61:755-764.
- Drapeau E, Nora AD. 2008. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7:569-589.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ. 2006. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139:1173-1185.
- Du AT, Schuff N, Amend D, Laakso MP, Hsu YY, Jagust WJ, Yaffe K, Kramer JH, Reed B, Norman D and others. 2001. Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:441-447.
- Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18:108-115.
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C. 2000. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* 48:732-739.
- Duman RS. 2009. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 11:239-255.

- Duyckaerts C, Panchal M, Delatour B, Potier MC. 2009. [Morphologic and molecular neuropathology of Alzheimer's disease]. *Ann Pharm Fr* 67:127-135.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. 1989. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414:600-612.
- Elul R. 1964. Regional differences in the hippocampus of the cat. I. Specific discharge patterns of the dorsal and ventral hippocampus and their role in generalized seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 16:470-488.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Escio-Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B. 2000. Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin. *Eur J Pharmacol* 405:63-72.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Faure A, Verret L, Bozon B, El Tannir El TN, Ly M, Kober F, Dhenain M, Rampon C, Delatour B. 2011. Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:407-418.
- Feder A, Nestler EJ, Charney DS. 2009. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* 10:446-457.
- Ferbinteanu J, McDonald RJ. 2000. Dorsal and ventral hippocampus—same or different? *Psychobiology* 28:314–324.
- Ferbinteanu J, McDonald RJ. 2001. Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippocampus* 11:187-200.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. 1997. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 17:1880-1890.

- Forster E, Zhao S, Frotscher M. 2006. Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7:259-267.
- Frotscher M, Zimmer J. 1983. Commissural fibers terminate on non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus -- a combined Golgi/EM degeneration study. *Brain Res* 265:289-293.
- Frotscher M, Zimmer J. 1983. Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J Comp Neurol* 215:299-311.
- Frotscher M, Leranth C, Lubbers K, Oertel WH. 1984. Commissural afferents innervate glutamate decarboxylase immunoreactive non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett* 46:137-143.
- Fujise N, Liu Y, Hori N, Kosaka T. 1998. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. *Neuroscience* 82:181-200.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357-9366.
- Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J. 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12:1090-1092.
- Gaudilliere B, Konishi Y, de I, I, Yao G, Bonni A. 2004. A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41:229-241.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. 2008. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586:3759-3765.
- Ge W, He F, Kim KJ, Blangi B, Coskun V, Nguyen L, Wu X, Zhao J, Heng JI, Martinowich K and others. 2006. Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1319-1324.
- Golgi C. 1873. Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. *Gazz Med Ital Lombardia*. 6 : 244-246.

- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, Rampon C. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171:769-778.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. 2001. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13:657-669.
- Gray WP, Sundstrom LE. 1998. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790:52-59.
- Greene JR, Radenahmad N, Wilcock GK, Neal JW, Pearson RC. 2001. Accumulation of calbindin in cortical pyramidal cells with ageing; a putative protective mechanism which fails in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:339-342.
- Gulyas AI, Toth K, Danos P, Freund TF. 1991. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 312:371-378.
- Gulyas AI, Miettinen R, Jacobowitz DM, Freund TF. 1992. Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience* 48:1-27.
- Gutierrez R, Heinemann U. 1999. Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain Res* 815:304-316.
- Hagan MM, Castaneda E, Sumaya IC, Fleming SM, Galloway J, Moss DE. 1998. The effect of hypothalamic peptide YY on hippocampal acetylcholine release in vivo: implications for limbic function in binge-eating behavior. *Brain Res* 805:20-28.
- Halasy K, Somogyi P. 1993. Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:411-429.
- Halasy K, Somogyi P. 1993. Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *J Hirnforsch* 34:299-308.
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P. 1993. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395-410.
- Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.

- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. 2002. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83:1509-1524.
- Hock BJ, Jr., Bunsey MD. 1998. Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci* 18:7027-7032.
- Houser CR. 1990. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535:195-204.
- Houser CR, Esclapez M. 1996. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 26:207-218.
- Houser CR. 1999. Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. *Adv Neurol* 79:743-761.
- Houser CR. 2007. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog Brain Res* 163:217-232.
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. 2004. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16659-16664.
- Hubel DH, Wiesel TN. 2009. Republication of *The Journal of Physiology* (1959) 148, 574-591: Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. 1959. *J Physiol* 587:2721-2732.
- Iacopino AM, Christakos S. 1990. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4078-4082.
- Jacobs BL, van PH, Gage FH. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5:262-269.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL and others. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159-170.
- Jarrard LE. 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9-26.
- Jay TM, Glowinski J, Thierry AM. 1989. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505:337-340.

- Jayatissa MN, Henningsen K, West MJ, Wiborg O. 2009. Decreased cell proliferation in the dentate gyrus does not associate with development of anhedonic-like symptoms in rats. *Brain Res* 1290:133-141.
- Jayatissa MN, Henningsen K, Nikolajsen G, West MJ, Wiborg O. 2010. A reduced number of hippocampal granule cells does not associate with an anhedonia-like phenotype in a rat chronic mild stress model of depression. *Stress* 13:95-105.
- Jefferys JG, Traub RD. 1998. 'Dormant' inhibitory neurons: do they exist and what is their functional impact? *Epilepsy Res* 32:104-113.
- Jessberger S, Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2707-2712.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343-347.
- Jinno S, Kosaka T. 2002. Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *J Comp Neurol* 449:1-25.
- Jinno S, Kosaka T. 2002. Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. *Brain Res* 945:219-231.
- Jinno S, Kosaka T. 2003. Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J Comp Neurol* 461:333-349.
- Jinno S, Kosaka T. 2004. Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector. *Neuroscience* 124:797-808.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Jung KH, Chu K, Kim M, Jeong SW, Song YM, Lee ST, Kim JY, Lee SK, Roh JK. 2004. Continuous cytosine-b-D-arabino-furanoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci* 19:3219-3226.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL. 1994. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* 14:7347-7356.

- Kaila K. 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42:489-537.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kaufmann WA, Barnas U, Humpel C, Nowakowski K, DeCol C, Gurka P, Ransmayr G, Hinterhuber H, Winkler H, Marksteiner J. 1998. Synaptic loss reflected by secretoneurin-like immunoreactivity in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 10:1084-1094.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kiyota T, Ingraham KL, Jacobsen MT, Xiong H, Ikezu T. 2011. FGF2 gene transfer restores hippocampal functions in mouse models of Alzheimer's disease and has therapeutic implications for neurocognitive disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1339-E1348.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M and others. 2005. Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25:9782-9793.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S and others. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55:306-319.
- Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF. 2004. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 9:609-20, 544.
- Kohler C, Swanson LW, Haglund L, Wu JY. 1985. The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience* 16:85-110.
- Kolb B, Buhrmann K, McDonald R, Sutherland RJ. 1994. Dissociation of the medial prefrontal, posterior parietal, and posterior temporal cortex for spatial navigation and recognition memory in the rat. *Cereb Cortex* 4:664-680.

- Korbo L, Amrein I, Lipp HP, Wolfer D, Regeur L, Oster S, Pakkenberg B. 2004. No evidence for loss of hippocampal neurons in non-Alzheimer dementia patients. *Acta Neurol Scand* 109:132-139.
- Koreli A. 1977. Influences of dorsal and ventral hippocampus on hypothalamic self-stimulation. *Physiol Behav* 19:713-717.
- Kosaka T. 1983. Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Res* 274:129-134.
- Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K. 1985. GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 239:420-430.
- Kuhn HG, Kinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ. 2010. Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4436-4441.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. 1992. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247-258.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van PH, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409.
- Laurberg S, Sorensen KE. 1981. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res* 212:287-300.
- Lavergne F, Jay TM. 2010. A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci* 4:192.
- Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844.
- Lee KW, Lee SH, Kim H, Song JS, Yang SD, Paik SG, Han PL. 2004. Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 76:572-580.

- Levin ED, Christopher NC, Weaver T, Moore J, Brucato F. 1999. Ventral hippocampal ibotenic acid lesions block chronic nicotine-induced spatial working memory improvement in rats. *Brain Res Cogn Brain Res* 7:405-410.
- Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2008. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:78-84.
- Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW, Huang Y. 2009. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5:634-645.
- Lindvall O, Kokaia Z. 2006. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094-1096.
- Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, Lowenstein DH. 2000. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:865-870.
- Liu P, Bilkey DK. 1998. Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 112:304-315.
- Liu P, Bilkey DK. 1998. Excitotoxic lesions centered on perirhinal cortex produce delay-dependent deficits in a test of spatial memory. *Behav Neurosci* 112:512-524.
- Liu P, Bilkey DK. 1998. Lesions of perirhinal cortex produce spatial memory deficits in the radial maze. *Hippocampus* 8:114-121.
- Liu Y, Fujise N, Kosaka T. 1996. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description. *Exp Brain Res* 108:389-403.
- Loiseau P, Jallon P. 1984. *Les epilepsies*. Masson, 3e edition, Paris.
- Lorente de No R. 1933. Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *J. PsJ&roi. Neurof.* 45, 381-438.
- Lorente de No R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. 1. *Psychol. Neural.* 46, 113-177.
- Loreth D, Ozmen L, Revel FG, Knoflach F, Wetzelschell P, Frotscher M, Metzger F, Kretz O. 2012. Selective degeneration of septal and hippocampal GABAergic neurons in a mouse model of amyloidosis and tauopathy. *Neurobiol Dis* 47:1-12.

- Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira d, V. 2012. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct* 217:93-106.
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. 1992. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 12:4846-4853.
- Lozsadi DA, Larner AJ. 2006. Prevalence and causes of seizures at the time of diagnosis of probable Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22:121-124.
- Lubke J, Frotscher M, Spruston N. 1998. Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata. *J Neurophysiol* 79:1518-1534.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czeh B. 2010. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:1-17.
- Lucassen PJ, Stumpel MW, Wang Q, Aronica E. 2010. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology* 58:940-949.
- Magloczky Z, Freund TF. 1993. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience* 56:317-335.
- Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF. 2000. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96:7-25.
- Maguire-Zeiss KA, Li ZW, Shimoda LM, Hamill RW. 1995. Calbindin D28k mRNA in hippocampus, superior temporal gyrus and cerebellum: comparison between control and Alzheimer disease subjects. *Brain Res Mol Brain Res* 30:362-366.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Markwardt S, Overstreet-Wadiche L. 2008. GABAergic signalling to adult-generated neurons. *J Physiol* 586:3745-3749.
- Markwardt SJ, Dieni CV, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2011. Ivy/neurogliaform interneurons coordinate activity in the neurogenic niche. *Nat Neurosci* .

- Masukawa LM, Burdette LJ, McGonigle P, Wang H, O'Connor W, Sperling MR, O'Connor MJ, Uruno K. 1999. Physiological and anatomical correlates of the human dentate gyrus: consequences or causes of epilepsy. *Adv Neurol* 79:781-794.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Levesque MF. 1995. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 21:133-147.
- McHugh SB, Fillenz M, Lowry JP, Rawlins JN, Bannerman DM. 2011. Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *Eur J Neurosci* 33:322-337.
- Ming GL, Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Mitchell J, Gatherer M, Sundstrom LE. 1995. Loss of hilar somatostatin neurons following tetanus toxin-induced seizures. *Acta Neuropathol* 89:425-430.
- Miyata T, Maeda T, Lee JE. 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 13:1647-1652.
- Mongiati LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF. 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4:e5320.
- Morgan RJ, Santhakumar V, Soltesz I. 2007. Modeling the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:639-658.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der KD. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Moser E, Moser MB, Andersen P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG. 1995. Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697-9701.
- Moser MB, Moser EI. 1998. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7535-7542.
- Muller RU, Kubie JL. 1987. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci* 7:1951-1968.
- Nadel L. 1968. Dorsal and ventral hippocampal lesions and behaviour. *Physiol Behav* 3:891-900.

- Nadel L. 1991. The hippocampus and space revisited. *Hippocampus* 1:221-229.
- Naegele JR, Barnstable CJ. 1989. Molecular determinants of GABAergic local-circuit neurons in the visual cortex. *Trends Neurosci* 12:28-34.
- Nagahara AH, Otto T, Gallagher M. 1995. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 109:3-9.
- Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, Kimura H. 2000. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41:10-18.
- Neher E, Sakmann B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9:65-75.
- Norris PJ, Faull RL, Emson PC. 1996. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Brain Res Mol Brain Res* 41:36-49.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- O'Keefe J, Conway DH. 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 31:573-590.
- O'Keefe, J. & Nadel, L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Oxford University Press, London).
- O'Keefe J, Speakman A. 1987. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res* 68:1-27.
- O'Keefe J, Burgess N. 1996. Geometric determinants of the place fields of hippocampal neurons. *Nature* 381:425-428.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J. 2001. The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64:129-155.
- Ogren SO, Kehr J, Schott PA. 1996. Effects of ventral hippocampal galanin on spatial learning and on in vivo acetylcholine release in the rat. *Neuroscience* 75:1127-1140.
- Ohl F, Fuchs E. 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res Cogn Brain Res* 7:379-387.

- Ohm TG. 2007. The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163:723-740.
- Onksen JL, Brown EJ, Blendy JA. 2011. Selective deletion of a cell cycle checkpoint kinase (ATR) reduces neurogenesis and alters responses in rodent models of behavioral affect. *Neuropsychopharmacology* 36:960-969.
- Oomura Y, Sasaki K, Li AJ. 1993. Memory facilitation induced by food intake. *Physiol Behav* 54:493-498.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL. 2006. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16:208-215.
- Overstreet WL, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. 2005. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol* 94:4528-4532.
- Packard MG, Cahill L, McGaugh JL. 1994. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8477-8481.
- Packard MG, Teather LA. 1998. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem* 69:163-203.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A and others. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711.
- Pan YW, Chan GC, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. 2012. Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory. *J Neurosci* 32:6444-6455.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727-3738.
- Parent JM, Janumpalli S, McNamara JO, Lowenstein DH. 1998. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett* 247:9-12.
- Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH. 1999. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J Neurosci* 19:4508-4519.
- Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH. 2006. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 59:81-91.

- Parent JM. 2007. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:529-540.
- Parent JM, Kron MM. 2012. *Neurogenesis and Epilepsy*. book .
- Passino E, mmassari-Teule M. 1999. Visual discrimination in inbred mice: strain-specific involvement of hippocampal regions. *Physiol Behav* 67:393-399.
- Pittenger C, Duman RS. 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.
- Pleasure SJ, Collins AE, Lowenstein DH. 2000. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J Neurosci* 20:6095-6105.
- Popovic M, Caballero-Bleda M, Kadish I, van GT. 2008. Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience* 155:182-191.
- Raisman G., Cowan W. M. and Powell T. P. S. 1965. The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* 88, 963-997.
- Ramon y Cajal S. 1893. Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann. Sac. Esp. Hist. Nat.* 22.
- Ramón y Cajal S. 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, Paris. Traduit de l'espagnol : *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Moya, Madrid, 1904, par Azoulay L. Traduit en anglais par Swanson N & Swanson LW (1995) : *Histology of the nervous system*. Oxford University Press, New York-Oxford.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D and others. 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:1658-1672.
- Ranck JB, Jr. 1973. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* 41:461-531.
- Ranck JB. 1984. Head direction cells in the deep cell layer of dorsal presubiculum in freely moving rats. *Soc Neurosci Abstr*, 10:599.
- Ratzliff AH, Howard AL, Santhakumar V, Osapay I, Soltesz I. 2004. Rapid deletion of mossy cells does not result in a hyperexcitable dentate gyrus: implications for epileptogenesis. *J Neurosci* 24:2259-2269.

- Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN. 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14:959-967.
- Ribak CE, Seress L. 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577-597.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG. 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14:835-857.
- Ribak CE, Seress L. 1988. A Golgi-electron microscopic study of fusiform neurons in the hilar region of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 271:67-78.
- Ribak CE, Nitsch R, Seress L. 1990. Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 300:449-461.
- Ribak CE, Shapiro LA. 2007. Ultrastructure and synaptic connectivity of cell types in the adult rat dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:155-166.
- Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JN, Feldon J, Bannerman DM. 1999. Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 113:1189-1203.
- Roybon L, Hjalt T, Stott S, Guillemot F, Li JY, Brundin P. 2009. Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4:e4779.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O and others. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, Ross ST, Hollrigel GS, Toth Z, Soltesz I. 2000. Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the 'irritable mossy cell' hypothesis. *J Physiol* 524 Pt 1:117-134.
- Satoh J, Tabira T, Sano M, Nakayama H, Tateishi J. 1991. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 81:388-395.

- Scharfman HE. 1994. EPSPs of dentate gyrus granule cells during epileptiform bursts of dentate hilar "mossy" cells and area CA3 pyramidal cells in disinhibited rat hippocampal slices. *J Neurosci* 14:6041-6057.
- Scharfman HE. 1995. Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *J Neurophysiol* 74:179-194.
- Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. 2000. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20:6144-6158.
- Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL. 2001. Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. *Neuroscience* 104:741-759.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40:599-636.
- Schott PA, Bjelke B, Ogren SO. 1998. Distribution and kinetics of galanin infused into the ventral hippocampus of the rat: relationship to spatial learning. *Neuroscience* 83:123-136.
- Schwarzer C, Williamson JM, Lothman EW, Vezzani A, Sperk G. 1995. Somatostatin, neuropeptide Y, neurokinin B and cholecystokinin immunoreactivity in two chronic models of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 69:831-845.
- Scott BW, Wang S, Burnham WM, De BU, Wojtowicz JM. 1998. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* 248:73-76.
- Scoville WB, Milner B. 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12:103-113.
- Seidel K, Helmeke C, Poeggel G, Braun K. 2008. Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala. *Dev Neurobiol* 68:1137-1152.
- Seki T. 2002. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res* 70:327-334.
- Seress L, Pokorny J. 1981. Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J Anat* 133:181-195.

- Seress L, Ribak CE. 1983. GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp Brain Res* 50:173-182.
- Seress L, Ribak CE. 1990. The synaptic connections of basket cell axons in the developing rat hippocampal formation. *Exp Brain Res* 81:500-508.
- Sharp PE, Blair HT, Cho J. 2001. The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal. *Trends Neurosci* 24:289-294.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.
- Sik A, Penttonen M, Buzsaki G. 1997. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur J Neurosci* 9:573-588.
- Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N. 1997. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 379:482-494.
- Sloviter RS. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235:73-76.
- Sloviter RS, Nilaver G. 1987. Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol* 256:42-60.
- Sloviter RS. 1991. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1:41-66.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476:458-461.
- Soltesz I, Mody I. 1994. Patch-clamp recordings reveal powerful GABAergic inhibition in dentate hilar neurons. *J Neurosci* 14:2365-2376.
- Song H, Kempermann G, Overstreet WL, Zhao C, Schinder AF, Bischofberger J. 2005. New neurons in the adult mammalian brain: synaptogenesis and functional integration. *J Neurosci* 25:10366-10368.
- Soriano E, Frotscher M. 1989. A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503:170-174.

- Soriano E, Nitsch R, Frotscher M. 1990. Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: Golgi-electron microscopy and immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 293:1-25.
- Soriano E, Frotscher M. 1993. GABAergic innervation of the rat fascia dentata: a novel type of interneuron in the granule cell layer with extensive axonal arborization in the molecular layer. *J Comp Neurol* 334:385-396.
- Soriano E, Frotscher M. 1994. Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus* 4:65-69.
- Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M. 1992. Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 50:831-846.
- Squire LR. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Stevens R, Cowey A. 1973. Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. *Brain Res* 52:203-224.
- Struble RG, Desmond NL, Levy WB. 1978. Anatomical evidence for interlamellar inhibition in the fascia dentata. *Brain Res* 152:580-585.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B. 1993. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423:511-518.
- Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, Gan L. 2009. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 5:624-633.
- Sutula TP, Dudek FE. 2007. Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. *Prog Brain Res* 163:541-563.
- Suzuki WA. 1996. The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 6:179-186.

- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, Van Der KN, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HW, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL. 2010. Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214:145-160.
- Takahashi K. 1965. Slow and fast groups of pyramidal tract cells and their respective membrane properties. *J Neurophysiol* 28:908-924.
- Tallent MK. 2007. Somatostatin in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:265-284.
- Tamimi R, Steingrimsson E, Copeland NG, Dyer-Montgomery K, Lee JE, Hernandez R, Jenkins NA, Tapscott SJ. 1996. The NEUROD gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2. *Genomics* 34:418-421.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27:3252-3259.
- Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. 1990. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci* 10:420-435.
- Toledo-Morrell L, Stoub TR, Wang C. 2007. Hippocampal atrophy and disconnection in incipient and mild Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163:741-753.
- Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. 2000. Impaired neurotransmitter systems by Abeta amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor. *Neurosci Lett* 292:155-158.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van PH, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727-734.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919-5924.
- van GT, Wyss JM. 1990. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol* 302:515-528.

- van PH, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP. 2000. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci* 20:2711-2718.
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van PW, Mishkin M. 1997. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277:376-380.
- Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7:399-412.
- Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. 2007. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 27:6771-6780.
- Vezzani A, Sperk G, Colmers WF. 1999. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neurosci* 22:25-30.
- Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA. 2007. Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:300-303.
- Wan H, Aggleton JP, Brown MW. 1999. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 19:1142-1148.
- Wenzel HJ, Buckmaster PS, Anderson NL, Wenzel ME, Schwartzkroin PA. 1997. Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 7:559-570.
- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA, Schwartzkroin PA. 2000. Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus* 10:244-260.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769-772.
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. 2004. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:1205-1212.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10:122-126.
- Wiener SI, Paul CA, Eichenbaum H. 1989. Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J Neurosci* 9:2737-2763.

- Wiig KA, Bilkey DK. 1994. The effects of perirhinal cortical lesions on spatial reference memory in the rat. *Behav Brain Res* 63:101-109.
- Wiig KA, Bilkey DK. 1994. Perirhinal cortex lesions in rats disrupt performance in a spatial DNMS task. *Neuroreport* 5:1405-1408.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van HT. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Witter MP, Moser EI. 2006. Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. *Trends Neurosci* 29:671-678.
- Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H. 1999. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397:613-616.
- Yew DT, Wong HW, Li WP, Lai HW, Yu WH. 1999. Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 89:675-686.
- Zappone CA, Sloviter RS. 2001. Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus: a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. *J Comp Neurol* 441:324-344.
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS. 2009. Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29:14247-14256.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zipp F, Nitsch R, Soriano E, Frotscher M. 1989. Entorhinal fibers form synaptic contacts on parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *Brain Res* 495:161-166.