



Dynamique intracellulaire des cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe pendant les états de veille

Meryl Malezieux

► To cite this version:

Meryl Malezieux. Dynamique intracellulaire des cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe pendant les états de veille. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0317 . tel-02411566

HAL Id: tel-02411566

<https://theses.hal.science/tel-02411566>

Submitted on 15 Dec 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale
Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Neurosciences

Par Méryl Malezieux

**Dynamique intracellulaire des cellules pyramidales de
CA3 dans l'hippocampe pendant les états de veille**

Sous la direction de : Christophe Mulle

Soutenue publiquement le 07 décembre 2018

Membres du jury :

Francis Chaouloff	Directeur de Recherche, INSERM	<i>Président</i>
David Dupret	Associate Professor, Univ. Oxford	<i>Rapporteur</i>
Paul Salin	Directeur de Recherche, CNRS	<i>Rapporteur</i>
Jérôme Epsztein	Chargé de Recherche, INSERM	<i>Examineur</i>
Christoph Schmidt-Hieber	Chargé de Recherche, CNRS	<i>Examineur</i>
Christophe Mulle	Directeur de Recherche, CNRS	<i>Directeur de thèse</i>

À mon père, qui m'a transmis ses passions pour la science et la recherche
À ma mère, et sa vie, qui m'ont donné l'envie d'étudier les neurosciences
À ma sœur, et son amour inconditionnel

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'honorer de leur présence : le Dr David Dupret, le Dr Paul Salin, le Dr Jérôme Epsztein, le Dr Christophe Schmidt-Hieber, ainsi que le Dr Francis Chaouloff, que je remercie également chaleureusement pour son encadrement lors de mes deux années de master, et pour sa disponibilité et son aide depuis mon tout premier stage en laboratoire.

Je tiens à remercier Christophe Mulle, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe et pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. J'ai énormément appris à tes côtés, tant sur le plan scientifique que sur l'aspect général de la recherche, de la formulation d'hypothèse au design d'expériences jusqu'à la communication des données. Je veux également te remercier de m'avoir encouragée et permis de partager mes données à de multiples occasions dans un grand nombre de congrès au cours de ma thèse. Enfin, je me sens extrêmement chanceuse d'avoir eu l'opportunité de participer à plusieurs écoles des Neurosciences, en tant qu'institutrice à Bordeaux mais aussi et surtout en tant qu'élève, au Portugal. Cette expérience a profondément marqué ma façon d'appréhender le monde de la recherche, et m'a permis de confirmer et d'accentuer mon enthousiasme et ma passion pour les neurosciences.

Merci à l'Agence Nationale de la Recherche et à la Fondation pour la Recherche Médicale pour leur soutien financier.

And now I am going to switch to english because I want to thank Ashley, for everything. I am so grateful I've met you and got to work closely with you. You are a wonderful scientist, and a wonderful human being. I am having difficulties to express in words how much you mean to me and how important you were during my whole PhD. I've grown immensely just by being close to you everyday. So thank you again.

Let me keep writing in english to thank Mario Carta, for mentoring me daily during my first years of PhD and for being there everyday when I needed him. I am happy I can now count you among my friends, because you were and you still are very inspiring, both scientifically and personally. Your advices have always been helpful, and apart from the fact that you seem to like Materazzi (?!!), you are an amazing person.

I also want to thank Marilena Griguoli, which whom I unfortunately did not get to spend a lot of time in the lab, but the few months we spend together were enough for me to realize how great you are. Thank you for teaching me the *in vivo* patch, without you none of the work presented in this thesis would exist. Thank you for your help throughout my PhD, even with the distance, I always knew I could count on you.

I want to thank my friends from the Lunch Gang (which is probably the less scary gang in the

world) : Mariela, Eva, Ruth, Carlita, Ania, Pascal. Having friends around when being at work has always been very important for me, and I have found in you guys the best friends I could wish for. I've liked every moment shared with you, both inside and outside the lab.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe, ceux qui sont encore là mais également ceux qui l'ont quittée : Stefano, Silvia, Anja, Pei, Sabine, Sandrine, Tomas, Dario, Nan, Jorge, Gaël, Thierry, Christophe, Séverine, Noëlle, Julie, Marine. Vous avez tous joué un rôle et eu un impact positif, personnel et/ou professionnel, au cours de ma thèse. Merci beaucoup.

J'ai une pensée émue pour Virginie et sa famille. Tu m'avais laissé un mot en quittant le laboratoire, que j'ai toujours avec moi, dans lequel tu mentionnais avoir été heureuse de faire tes derniers pas sur le chemin de la science en ma compagnie. De mon côté, je suis heureuse et honorée d'avoir fait mes premiers pas sur le chemin de la science en ta compagnie. Je ne t'oublierai jamais.

Merci à mes amis, ceux de toujours, ceux qui pendant toutes ces années m'ont soutenue et ont cru en moi. Ceux qui savent. Sans vous je ne serai pas qui je suis aujourd'hui, vous m'influencez, m'inspirez, uniquement en étant vous-même. Merci pour toute la vie.

Et enfin, merci à ma famille. Celle du début et celle d'aujourd'hui. Ma mère, mon père, mes soeurs. Mais aussi Danièle et toute sa (bientôt "ma") famille. L'idée des futurs repas nombreux et bruyants à Soustons, Paris ou Bordeaux pendant les années à venir me remplit de bonheur. Merci Danièle de prendre soin de mon père et de notre famille.

Merci à tous, amis et famille, pour votre amour, votre soutien et votre compréhension. Merci de m'avoir aidée dans les moments les plus durs.

A ce propos, vous vous rappelez quand je me suis déboité le coude **et** le genou à 4 mois de la fin de ma thèse ? C'était marrant non ?!

Résumé

Les états de veille sont composés d'états cérébraux distincts, corrélés avec différents comportements et caractérisés par des oscillations spécifiques observables dans le potentiel de champ local (Local Field Potential, LFP). Bien que les différents états cérébraux et leur signature dans le LFP aient été caractérisés, les mécanismes cellulaires sous-jacents restent à ce jour peu connus. Des changements des propriétés de neurones uniques seraient corrélés avec, et pourraient participer à la génération de ces changements d'états cérébraux. L'activité coordonnée et synchronisée de neurones facilite certains processus cognitifs tels que la mémoire. L'hippocampe joue un rôle essentiel dans les mémoires spatiale et épisodique, et dans l'hippocampe, CA3 est important pour la formation d'associations facilitant l'encodage rapide de la mémoire. De plus, les informations provenant du cortex entorhinal, du gyrus denté, et de CA3 même sont comparées et intégrées dans CA3 avant d'être transmises à CA1. Lors de périodes de repos, le LFP hippocampique présente une activité large et irrégulière (Large Irregular Activity, LIA), ponctuée par des oscillations plus rapides, les sharp-wave ripples, jouant un rôle dans la consolidation de la mémoire. Lors de périodes exploratoires, le LFP hippocampique oscille aux fréquences theta (6-12 Hz) et gamma (30-100 Hz). Les cellules pyramidales (CP) de CA3 jouent un rôle important dans chacun de ces états. Dans le but d'étudier les modulations intracellulaires des CP de CA3, nous avons réalisé des enregistrements de patch-clamp en configuration cellule entière chez l'animal éveillé. Nous avons associé ces enregistrements avec des mesures du diamètre pupillaire et de la vitesse de locomotion de l'animal, ainsi qu'avec l'enregistrement de l'activité oscillatoire du LFP dans l'hippocampe. Nos résultats montrent que certaines CP de CA3 sont sensibles à la modulation intracellulaire lors de différents rythmes hippocampiques, et ont tendance à diminuer leur potentiel de membrane moyen, leur variance et leur décharge de potentiel d'action lors des oscillations theta par rapport aux périodes de LIA. De futures études permettront de déterminer si ces changements sont dus à des changements d'entrées synaptiques et/ou de neuromodulateurs. Ces modulations pourraient jouer un rôle dans l'émergence des rythmes oscillatoires du LFP, et permettre à CA3 de réaliser des fonctions mnésiques spécifiques à différents moments.

Abstract

Wakefulness is comprised of distinct brain states, correlated with different behaviors and characterized by specific oscillatory patterns in the local field potential (LFP). While much work has characterized different brain states and their LFP signatures, the underlying cellular mechanisms are less known. Changes in single cell properties are thought to correlate with and possibly result in these changes in brain state. Synchronized and coordinated activity among distributed neurons supports cognitive processes such as memory. The hippocampus is essential for spatial and episodic memory, and within the hippocampus, area CA3 is important for rapid encoding of one-trial memory. Additionally, CA3 is the site where information from the entorhinal cortex, dentate gyrus, and CA3 itself is compared and integrated before output to CA1. During quiet wakefulness, the hippocampal LFP displays large irregular activity (LIA) punctuated by sharp-wave ripples, which play a role in memory consolidation. During exploratory behaviors, hippocampal LFP oscillates at both theta and gamma frequencies. CA3 pyramidal cells (PCs) play an important role in each of these brain states. We explored the changes that occur in the intracellular dynamics of CA3 PCs during changes in brain state, by using whole-cell patch-clamp recordings from CA3 PCs in awake head-fixed mice. We combined those recordings with measurements of pupil diameter, treadmill running speed and LFP recordings of oscillatory activity. Our findings show that some CA3 PCs are prone to intracellular modulation during brain rhythms, and tend to decrease their average membrane potential, excitability, variance and output firing during theta as compared to LIA. Future studies will demonstrate whether these effects are due to changes in synaptic and/or neuromodulatory inputs. This modulation at the single-cell level in CA3 could play a role in the emergence of oscillations, and underlie the ability of CA3 to perform different memory functions during different brain states.

Avant-propos

Cette thèse a été menée à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences à Bordeaux, au sein de l'équipe "Circuits Synaptiques de la Mémoire", sous la direction de Christophe Mulle.

La mémoire de type épisodique, également appelée mémoire autobiographique, est encodée dans une sous-région de l'hippocampe, CA3. Les circuits neuronaux de cette région permettent la formation d'association entre des informations multimodales sensorielles et spatiales. Cet encodage a lieu lors d'un état cérébral correspondant à un état d'éveil important, favorisant la communication et l'activité synchrone de population de neurones. La consolidation de la mémoire encodée pendant ces périodes s'effectue pendant des périodes d'éveil plus faible ou de sommeil. La modulation intracellulaire des neurones de CA3 pendant ces différents états pourrait permettre à CA3 de réaliser des fonctions mnésiques distinctes à différents moments. Pendant ma thèse, j'ai réalisé des enregistrements électrophysiologiques de cellules principales de CA3, chez l'animal anesthésié et éveillé, dans le but de caractériser les propriétés de ces cellules dans un réseau intact.

Pour introduire ce travail, je décrirai d'abord l'anatomie, la connectivité et la plasticité des circuits de CA3. Je parlerai des caractéristiques de ces réseaux par rapport aux autres circuits corticaux, et de leur conservation au cours de l'évolution. Je décrirai ensuite le rôle de CA3 dans l'intégration des informations spatiales et contextuelles.

Je parlerai des données existantes quant à l'activité électrophysiologique des neurones de l'hippocampe, et de la relation entre cette activité et les oscillations hippocampiques, leurs corrélats comportementaux et leurs corrélats physiologiques.

Enfin, parce que le dysfonctionnement de ces circuits a des conséquences importantes, je parlerai des maladies ayant un lien avec CA3, notamment l'épilepsie du lobe temporal et la maladie d'Alzheimer.

Dans une deuxième grande partie, je décrirai les approches méthodologiques utilisées pour l'obtention des résultats de ce mémoire. J'introduirai les différentes méthodes permettant d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques *in vivo*, et plus précisément les techniques que j'ai utilisé, telles que les enregistrements de patch-clamp en configuration cellule-entière, et les enregistrements des potentiel de champs.

En plus de ce projet principal, j'ai également participé à différents projets au cours de ma thèse. Le premier de ces projets concerne le contrôle du transfert d'information entre le gyrus denté et CA3 par l'activation des récepteurs GABAA et GABAB (**Annexe 1**). Cette étude a été réalisée *in*

vivo chez l'animal anesthésié, et a permis de mettre en évidence que les propriétés de plasticité à court terme aux synapses entre les cellules du gyrus denté et de CA3 sont conservées dans un réseau intact, et que l'activité des cellules du gyrus denté entraîne une activation importante des interneurons de CA3. En fonction de la fréquence d'activation des cellules du gyrus denté, les cellules de CA3 seront soit inhibées, soit activées, définissant une fenêtre temporelle optimale pour le transfert efficace de l'information entre le gyrus denté et CA3.

Un deuxième projet auquel j'ai participé a permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs à l'adénosine A2A neuronaux dans les déficits synaptiques précoces présents aux synapses CA3-CA3 dans le modèle APP/PS1 de la maladie d'Alzheimer (**Annexe 2**).

Ce manuscrit se focalise sur mon projet principal concernant la dynamique intracellulaire des cellules pyramidales de CA3 lors de différents états de veille.

Table des matières

Abréviations	1
1 Introduction	3
1.1 CA3 : anatomie, connectivité et plasticité	3
1.1.1 La formation hippocampique	3
1.1.2 Les neurones de CA3	4
1.1.2.a Les cellules pyramidales	4
1.1.2.b Les interneurones	6
1.1.3 Connectivité locale	9
1.1.3.a Entrées du gyrus denté	9
1.1.3.b Connexions CA3-CA3	13
1.1.3.c Sorties : les collatérales de Schaffer	15
1.1.4 Entrées du cortex entorhinal	17
1.1.5 Conservation et divergence au cours de l'évolution	18
1.2 CA3 : physiologie et fonctions - intégration des informations spatiales et contextuelles	20
1.2.1 Mémoire spatiale : l'hippocampe comme carte cognitive	20
1.2.1.a Découverte des cellules de lieu	20
1.2.1.b Propriétés des cellules de lieu	21
1.2.2 Mémoire épisodique : où, quand, comment	23
1.2.2.a Définition	23
1.2.2.b CA3 et mémoire épisodique	24
1.2.3 Les oscillations de l'hippocampe	29
1.2.3.a Le rythme Theta	31
1.2.3.b Le rythme Gamma	35
1.2.3.c Activité large et irrégulière (LIA)	36
1.2.3.d Activité faible et irrégulière (SIA)	38
1.3 Activité électrophysiologique des neurones de l'hippocampe	38
1.3.1 Les différents enregistrements électrophysiologiques	38
1.3.2 Activités intracellulaires liées aux oscillations	41
1.4 CA3 et maladies	43
1.4.1 Épilepsie	44
1.4.2 Maladie d'Alzheimer	45

2	Approches méthodologiques	47
2.1	Les enregistrements électrophysiologiques <i>in vivo</i>	47
2.1.1	Les potentiels de champs	48
2.1.2	Les enregistrements extracellulaires	48
2.1.2.a	Les enregistrements extracellulaires multi-unitaires	49
2.1.2.b	Les enregistrements extracellulaires de cellules uniques	49
2.1.3	Les enregistrements intracellulaires	50
2.1.4	La technique du patch-clamp	51
2.1.4.a	Historique et applications	51
2.1.4.b	La technique du patch-clamp <i>in vivo</i>	55
2.2	Enregistrements chez l'animal éveillé tête-fixée	56
2.2.1	Implantation de barres de tête	57
2.2.2	Habituation des animaux	57
2.2.3	Enregistrements des variables physiologiques et comportementales	58
2.3	Contrôles post-hoc	59
2.4	Analyses des données et statistiques	59
3	Objectifs de la recherche	63
3.1	Définition du périmètre	63
3.2	Objectifs	63
4	Résultats - Discussion	66
	Article :	
	"Intracellular dynamics of CA3 pyramidal cells across brain states"	66
4.1	Problématique	66
4.2	Résultats	67
4.3	Discussion	104
5	Perspectives	109
5.1	Neuromodulation : rôle de l'acétylcholine	109
5.2	Localisation et caractérisation morphologique des CP de CA3	113
5.3	Rôle des entrées du gyrus denté	114
6	Conclusion	117
	Références	118
	Liste des figures	142
7	Annexes	144
A	Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABA A and GABA B Receptor-Mediated Inhibition.	145

B Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors.	157
C Supplementary information	168

Abréviations

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
APV : acide 2-amino-5-phosphonovalérique
CE : cortex entorhinal
CEL : cortex entorhinal latéral
CEM : cortex entorhinal médian
CG : cellule granulaire
CP : cellule pyramidale
CPSE : courant post-synaptique exciteur
DLT : dépression à long-terme
EEG : électroencéphalogramme
ELT : épilepsie du lobe temporal
fm : fibre moussue
GABA : acide γ -aminobutyrique
GD : gyrus denté
HCN : Hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotid modulated cation non-selective channel
LFP : local field potential
LIA : large irregular activity
mGluR : récepteur métabotrope au glutamate
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
PLT : potentiation à long-terme
PPSE : potentiel post-synaptique exciteur
PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur
PV : parvalbumine
rAMPA : récepteur au glutamate de type AMPA
rNMDA : récepteur au glutamate de type NMDA
RM : raphé médian
RPO : reticularis pontis oralis
SIA : small irregular activity
SM : septum médian
STDP : spike-timing dependent plasticity
SUM : supramammillary nucleus
SWR : sharp-wave ripples
Vm : potentiel de membrane

INTRODUCTION

Introduction

1.1 CA3 : anatomie, connectivité et plasticité

1.1.1 La formation hippocampique

La formation hippocampique comprend traditionnellement 6 régions cérébrales :

- le gyrus denté (GD)
- l'hippocampe "*hippocampus proper*", composé des 3 subdivisions de la Corne d'Ammon CA3, CA2 et CA1
- le subiculum
- le parasubiculum
- le presubiculum
- le cortex entorhinal (CE) (Fig. 1.1).

Bilatérale, la formation hippocampique est située dans le lobe temporal médian. Depuis 1900 et la description post-mortem par Vladimir Bekhterev de cerveaux de patients présentant des déficits mnésiques ainsi qu'un amincissement des tissus hippocampiques, et plus tard en 1957 la description par Scoville et Milner (Scoville and Milner 1957) des séquelles mnésiques suite à l'ablation bilatérale de l'hippocampe du patient H.M., il est largement accepté que la formation hippocampique joue un rôle important dans l'encodage et le stockage de la mémoire.

Plus tard, en 1971, John O'Keefe découvre les cellules de lieu dans l'hippocampe (O'Keefe and Dostrovsky 1971), et met de ce fait en évidence que ce dernier joue un rôle important dans la navigation, en plus de son rôle dans les processus mnésiques.

Les 6 régions mentionnées ci-dessus forment la formation hippocampique parce qu'elles sont connectées fonctionnellement. Le CE projette au GD, à CA3, CA1 et au subiculum. Le GD projette à CA3 via les fibres moussues (fm), CA3 projette à CA1 via les collatérales de Schaffer, et forme également un réseau auto-associatif dense en renvoyant des projections à lui-même, ipsi- et controlatérales, formant le réseau excitateur CA3-CA3. Enfin, CA1 projette au subiculum et renvoie des projections au CE, et le subiculum connecte les pré- et parasubiculum et le CE également (Fig. 1.1).

Dans la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons essentiellement à la sous-région CA3, son architecture, sa connectivité, et ses fonctions.

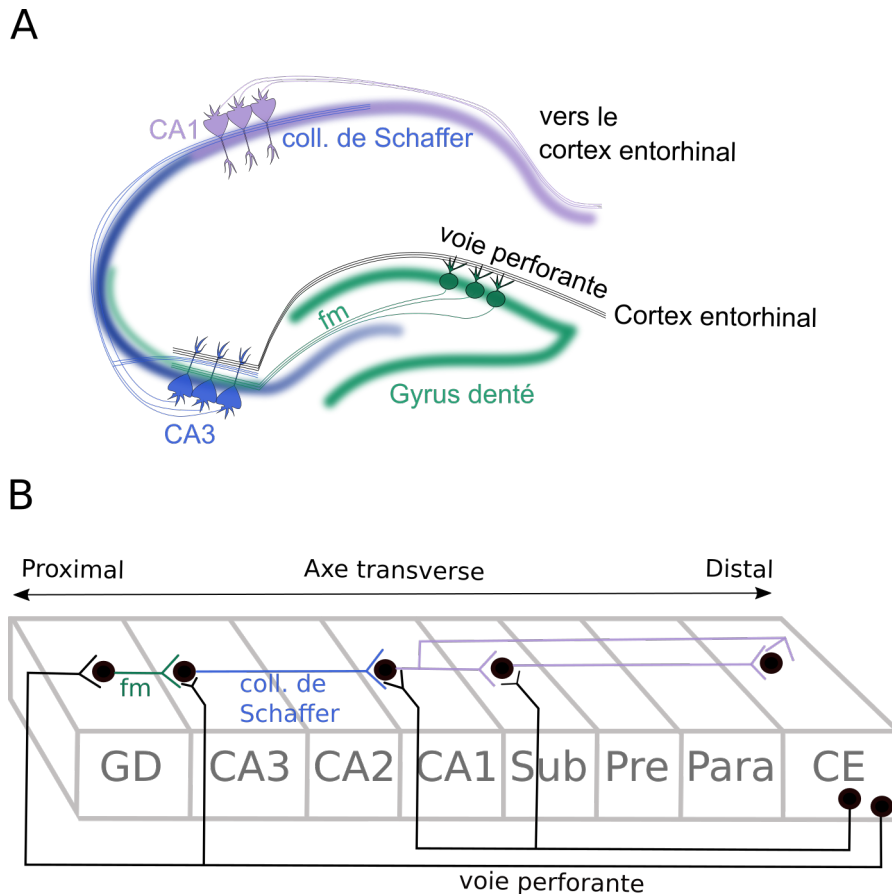


Fig. 1.1.: La formation hippocampique. (A) Les neurones de la couche II du cortex entorhinal (CE) projettent au gyrus denté (GD) et à CA3 via la voie perforante (noir). Les cellules granulaires du GD projettent à CA3 via les fm (vert). Les CP de CA3 projettent à CA1 via les collatérales de Schaffer (bleu). CA1 projette en retour au CE (mauve). (B) Projections de la formation hippocampique selon l'axe transverse. Le GD est proximal, et le CE est en position distale. fm : fm; coll. : collatérales; Sub : subiculum; Pre : presubiculum; Para : parasubiculum. Adapté de Andersen et al. 2009.

1.1.2 Les neurones de CA3

1.1.2.a. Les cellules pyramidales

Morphologie et contacts. La cellule principale de l'hippocampe est la cellule pyramidale (CP). Celle de CA3 présente de grandes similarités avec celle de CA1, mais a un corps cellulaire plus grand avec une aire totale de surface 2 à 4 fois plus grande que celle qu'occupe CA1 (Curtsuridis et al. 2012). Son corps cellulaire se trouve dans le *stratum pyramidale*, ses dendrites apicales s'étendent vers la fissure hippocampique et traversent de ce fait les *stratum lucidum*, *radiatum* et *lacunosum moleculare*, et ses dendrites basales s'étendent dans le *stratum oriens* (Fig. 1.2). Chez le rat, on estime entre 250 000 (West et al. 1991) et 300 000 le nombre de CP de CA3. Il est raisonnable d'estimer que chez la souris le nombre de CP est du même ordre de grandeur que chez le rat, cependant il est difficile d'en trouver le nombre exact dans la littérature.

Les entrées excitatrices reçues par les CP de CA3 suivent une organisation précise sur l'arbre dendritique de ces dernières. Les dendrites apicales les plus distales, se situant dans le *stratum lacunosum-moleculare*, reçoivent des informations de la couche II du CE, alors que leur portion médiale, dans le *stratum radiatum* reçoit des informations d'autres CP de CA3. Une particularité de ces cellules réside dans la présence de "thorny excrescences" ou excroissances épineuses, des épines dendritiques se trouvant sur la branche principale de l'arbre dendritique apical, avant qu'elle ne se divise, dans le *stratum lucidum*, proche du corps cellulaire appelé soma (Fig. 1.2). Ces épines dendritiques particulières sont contactées exclusivement par les fm (Fig. 1.3). Les dendrites basales des cellules de CA3a, les plus proches du GD, sont aussi parfois connectées par les fm et présentent donc post-synaptiquement des excroissances épineuses. Les autres dendrites basales sont contactées par d'autres CP de CA3.

Le nombre d'excroissance épineuse par cellule est estimé à 41 en moyenne (Gonzales et

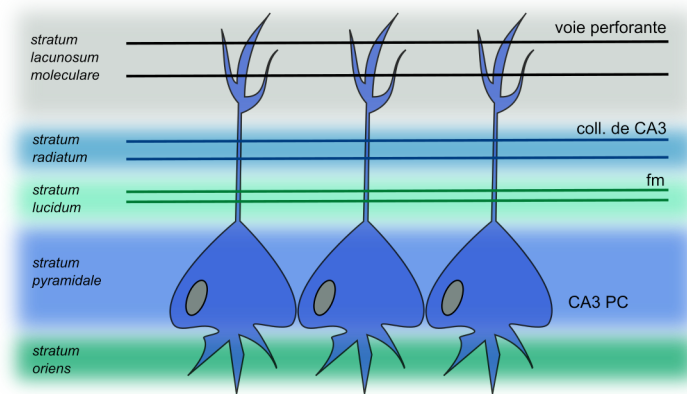


Fig. 1.2.: Organisation laminaire de la région CA3. Les différentes afférences de CA3 sont organisées de manière stricte sous forme de couches parallèles et distinctes. Les fm provenant du GD projettent sur la partie proximale des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 dans le *stratum lucidum*. Les axones de CA3 projettent sur d'autres CP de CA3 et forment les collatérales récurrentes des voies associatives et commissurales (A/C), et contactent les CP plus distalement, dans le *stratum radiatum*. La voie perforante, constituée des axones des CP du CE projette sur les CP de CA3 dans le *stratum lacunosum-moleculare*.

al. 2001), et chaque épine est contactée par une fm, ce nombre définissant donc la convergence des CG sur les CP de CA3. Chaque CP peut être contactée par jusqu'à 50 fm (Amaral et al. 1990), ce qui signifie donc que chaque CP est influencée par 0.005% des CG (il en existe 1 000 000 dans le GD), définissant une connexion éparsée et divergente. Dans ces post-synapses se trouvent des organelles présentes dans toutes les synapses, nécessaires à leur bon fonctionnement comme les ribosomes, mais aussi d'autres organelles absentes des synapses traditionnelles, telles que les mitochondries et les microtubules (Blackstad and Kjaerheim 1961).

Le nombre de contacts effectués via la voie perforante depuis la couche II du CE sur les dendrites de CA3 sont de 4×10^3 chez le rat, mais le nombre le plus élevé de contacts sur les CP de CA3 proviennent des récurrentes axonales collatérales d'autres pyramidales de CA3 et s'élève au nombre de 1.2×10^4 (Amaral et al. 1990). Par contraste aux 0.005% d'innervation provenant des CG, une CP est contactée par 6000 autres CP, ce qui représente 1.9% de la population (mais voir 1.1.3.). Ces connexions seraient donc convergentes et optimisées pour une intercommunication

efficace.

Chaque CP donne naissance à un seul axone qui peut (i) s'étendre vers CA2 ou CA1 et de ce fait constituer ce que l'on nomme les collatérales de Schaffer, (ii) connecter ipsi- ou contra-latéralement d'autres CP de CA3, ou enfin (iii) s'étendre vers le noyau septal latéral (Ishizuka et al. 1990).

Propriétés physiologiques. Les CP de CA3 ont la capacité de décharger des potentiels d'actions seuls ou sous forme de bursts. Un burst est un événement unique, durant typiquement entre 30 et 50 ms, présentant de multiples potentiels d'actions à une fréquence élevée, pouvant aller jusqu'à 300 Hz (Wong et al. 1979). Ces bursts sont soit générés spontanément et ne nécessitent pas de connexion synaptique, grâce à une dépolarisation survenant à la suite d'un potentiel d'action (ADP pour afterdepolarization), et qui entraîne la génération du burst. Certains bursts sont générés à la suite d'activation synaptique, grâce à un ADP mais aussi à la présence de potentiels calciques dendritiques (Wong and Prince 1978). Les données disponibles sur la physiologie des CP de CA3 ont pour la plupart été récoltées sur tranches d'hippocampes *in vitro*, et peu de données sont disponibles concernant les propriétés physiologiques de ces cellules *in vivo*, ces dernières ayant de plus toutes été récoltées chez l'animal anesthésié. Une différence majeure entre les deux configurations concerne le potentiel de membrane de ces cellules au repos, qui est plus hyperpolarisé en tranches qu'à l'intérieur du réseau intact *in vivo*. Cela est également vrai pour CA1 (Henze and Buzsáki 2001). Concernant CA3, le potentiel de repos chez l'animal anesthésié a été reporté à $-56.9 \text{ mV} \pm 0.7 \text{ mV}$ (Kowalski et al. 2016). Il est raisonnable de penser que chez l'animal éveillé, l'activité synaptique étant plus importante, le potentiel de repos des CP de CA3 pourrait être plus dépolarisé chez l'animal éveillée qu'anesthésié. (Kowalski et al. 2016). Chez l'animal anesthésié, les CP de CA3 déchargent à $3.4 \pm 0.9 \text{ Hz}$. Ces cellules sont plus actives que les CG du GC qui ont tendance à ne décharger que très rarement, et moins actives que les CP de CA1 (Kowalski et al. 2016). De plus, il existe à l'intérieur de CA3 des différences entre les propriétés morphologiques et intrinsèques des CP en fonction de leur position selon l'axe proximo-distal ainsi que de leur innervation ou non par les fm (voir la section 5 de ce mémoire).

1.1.2.b. Les interneurones

Même s'ils ne représentent que 10% de la totalité des neurones, il existe une riche diversité d'interneurones dans l'hippocampe, jouant un rôle majeur sur l'activité des CP. La classification de ces derniers peut se faire selon différents critères, qu'ils soient morphologiques, anatomiques, moléculaires, ou physiologiques. En plus de pouvoir contrôler finement l'activité des cellules principales glutamatergiques, ils ont aussi la possibilité de synchroniser des population de neurones et jouent donc un rôle important dans la génération ou la maintenance de certaines oscillations présentes dans l'hippocampe comme les oscillations theta, gamma et les sharp-waves (Klausberger et al. 2003). Une particularité de ces interneurones est que leur corps cellulaire ne se retrouve pas exclusivement dans une seule couche de CA3 contrairement à ceux des CP qui se

retrouvent uniquement dans le *stratum pyramidale*.

Les interneurons présents dans CA3 peuvent recevoir des informations (i) des CG du GD via les filopodes ou les boutons *en passant* des fm, constituant une inhibition en feed-forward, (ii) des CP de CA3, constituant une inhibition en feed-back, (iii) des cellules GABAergiques à projections longues du septum median, et (iv) d'autres interneurons, entraînant de ce fait une désinhibition des CP.

La classification des interneurons selon leur position anatomique, telle que les interneurons axo-axoniques, ou somato-dendritiques, donnent des informations quant aux rôles potentiels de ces cellules. En effet, ces classes d'interneurons ciblent préférentiellement le soma ou le segment initial de l'axone, où les potentiels d'actions sont générés, et peuvent donc contrôler la génération ou la propagation du potentiel d'action post-synaptique. En revanche, la classification la plus utilisée dans la littérature est basée sur l'identité neurochimique des interneurons (Tab. 1.1).

Contacts fm-interneurons. L'inhibition feed-forward des pyramidales de CA3 par les fm a reçu une attention particulière et semblerait jouer un rôle important sur l'activité des CP. En effet, les fm contactent un grand nombre d'interneurons, qui ensuite inhibent les CP, généralement au niveau de leur soma. Contrairement aux boutons synaptiques géants formés par les fm sur les dendrites des cellules principales, les boutons synaptiques sur les interneurons sont significativement plus petits et proviennent soit de contacts *en passant*, soit de filopodes (jusqu'à 9 (Kamondi et al. 1998b)) qui s'étendent directement des boutons géants mentionnés ci-dessus. Il semblerait que ces filopodes soient d'ailleurs la cible d'une plasticité morphologique à la suite d'un apprentissage (Donato et al. 2013). Une seule fm contacte 30 à 50 neurones GABAergiques contre seulement 10-20 CP (Toth et al. 2000). Une étude de 2009 publiée dans *The Journal of Neuroscience* par Janos Szabadics and Ivan Soltesz (Szabadics and Soltesz 2009) a étudié 4 types différents d'interneurons que les fm innervent, incluant des interneurons périsomatiques, et dendritiques :

- des IvyCells
- des cellules en panier déchargeant régulièrement (Regular spiking basket-cells)
- des cellules en panier déchargeant rapidement (Fast spiking basket-cells)
- des interneurons épineux du *lucidum* (spiny lucidum cells).

Tous ces contacts présentent des formes de plasticité à court terme différentes, et ces interneurons font des synapses sur des portions définies de l'arbre dendritique des CP de CA3, exerçant potentiellement un contrôle à tous les niveaux de la cellule. Les contacts fm-interneurons présentent généralement une probabilité de libération ainsi qu'une taille quantale plus importante que celles des contacts fm-CP de CA3, ce qui leur confère une transmission des potentiels d'action efficace même à des fréquences faibles, et ce *in vitro* (Lawrence and McBain 2003) ou *in vivo*. En effet, *in vivo*, l'inhibition induite par l'activation des CG chez l'animal anesthésié entraîne une forte inhibition des CP suite à l'activation de récepteurs GABAA et GABAB (Zucca et al. 2017). Le rôle de cette forte inhibition pourrait être de contenir la sur-excitation des cellules principales afin d'éviter une sur-excitation de ces-dernières, mais également de définir une fenêtre temporelle optimale pour le transfert efficace de l'information du GD à CA3.

Type cellulaire	Distribution laminaire		Cibles	Afférences		Marqueurs neurochimiques	
	Dendrites	Axones		Intrahippocampiques	Extra	CBPs/NOS	Neuropeptides
Axo-axonique	Toutes couches	s.p., s.o.	s.i. CP	CA3, fm	CE, SM	PV	-
Panier 1	Toutes couches	s.p., s.o., s.r.	soma, dp	CA3, fm	CE, SM	PV	-
Panier 2	Toutes couches	s.p., s.o., s.r.	soma, dp	CA3, fm	SM, RM	CB(±)	CCK, VIP(±)
O-LM	s.o., s.r., s.p., s.l.	sl-m, s.o., s.r.	dd	CA3, fm	SM, RM	CB(±)	SOM, NPY
Bistratifié	s.o., s.r., s.l., s.p.	s.r., s.o., s.p.	dp, dd	CA3, fm	SM, RM	CB, NOS(?)	NPY(±)
Radial trilaminaire	Toutes couches	s.r., s.p., s.o.	dp, dd	CA3, fm	SM, RM, CE	CB (±)	NPY(?), CCK(?)
Epineux CR	s.l.	sl-m., s.r., s.m.	dd(?)	fm	SM	CR	SOM, NPY(?)
IS-1 (CR lisse)	Toutes couches	s.r., s.p., s.o.	s.i, dp.i, dd.i	CA3, fm	SM, RM, (CE)	CR	VIP(±)
IS-2 (VIP)	Toutes couches	s.o., alv, s.p., s.r	s.i., dp.i, dd.i	CA3, fm	CE, SM	CR(±)	VIP

Tab. 1.1.: Liste des caractéristiques morphologiques et neurochimiques des interneurons identifiés de CA3. s.i. : segment initial, dd : dendrites distales, dp : dendrites proximales, s : soma, i : interneurone, IS-1 : cellule sélective des interneurons 1, IS-2 : cellule sélective des interneurons de type 2, RM : raphé médian, SM : septum médian, dp : dendrites proximales, s.p. : *stratum pyramidale*, s.r. : *stratum radiatum*, s.o. : *stratum oriens*, sl-m. : *stratum lacunosum-moleculare*, s.l. : *stratum lucidum*, CBPs : calcium-binding proteins (protéines fixant le calcium), PV : parvalbumine, CR : calretinine, CB : calbindin, VIP : vasoactive intestinal polypeptide, NPY : neuropeptide Y. Adapté de Freund and Buzsáki 1998

Contrôle des oscillations. Les oscillations gamma (30-100 Hz) peuvent être générées intrinsèquement *in vivo* dans CA3 (Csicsvari et al. 2003). L'excitation récurrente des interneurons par les CP de CA3 entraîne la synchronisation de réseaux locaux d'interneurons pendant ces oscillations (Bartos et al. 2002). Les interneurons projetant périssomatiquement sur les CP de CA3 contrôlent précisément la décharge de ces ensembles de cellules principales. La décharge d'une seule CP peut entraîner une inhibition disynaptique via l'inhibition en feedback mentionnée précédemment, et ce sur une large distance (800 μ m), inhibant les dendrites et les zones périssomatiques des CP de CA3 (Bazelot et al. 2010 Beyeler et al. 2013). Les interneurons axo-axoniques, qui projettent sur le segment initial de l'axone des CP, contrôlent également leur décharge durant les oscillations gamma (Dugladze et al. 2012), et empêchent la génération de potentiels d'action antidromiques.

Les sharp waves ripples (SWR), des oscillations rapides présentent pendant les périodes d'immobilité chez l'animal éveillé et certaines phases du sommeil (voir 1.2.3.), semblent être générées dans CA3 avant de se propager dans CA1 (Csicsvari et al. 2000). Elles peuvent être générées *in vitro* par une seule CP de CA3, qui ensuite excite les interneurons GABAergiques (Bazelot et al. 2016). Les interneurons PV-positifs jouent un rôle dans l'initiation des SWR, probablement via un mécanisme d'interaction réciproque entre eux et les CP CA3 qui synchronisent leur décharge et génèrent une oscillation à autre fréquence (correspondant aux "ripples") (Schlingloff et al. 2014). *In vivo*, les projections GABAergiques du septum médian inhibent l'activité des interneurons axo-axoniques pendant les SWR, suggérant un rôle important de ces projections dans la coordination de l'activité des CP de CA3 (Viney et al. 2013).

1.1.3 Connectivité locale

Comme mentionné précédemment, les CP de CA3 sont contactées par les axones des CG du GD, donnant naissance aux fm. De plus, elles forment entre elles un réseau interconnecté dense, en envoyant des collatérales axonales ipsi- et contralatéralement sur d'autres CP de CA3.

1.1.3.a. Entrées du gyrus denté

Les entrées du GD via les fm ont des propriétés morphologiques, pharmacologiques et physiologiques différentes des projections corticales classiques.

Anatomie. Les fm ont été premièrement observées par Camillo Golgi (Golgi 1885), puis nommées par Santiago Ramon y Cajal d'après leur anatomie similaire aux fibres présentes dans le cervelet que Cajal avait déjà nommé fibres moussues. En effet, les multiples varicosités et les extensions filamenteuses des fm hippocampiques et du cervelet ont l'apparence de la mousse. Chaque CG du GD (1 000 000 chez le rat et 15 000 000 chez l'homme (Simić et al. 1997)) donne naissance à un axone non-myélinisé qui se divise ensuite en de plus fines branches. Il peut d'abord contacter dans le hilus du GD des cellules moussues et des interneurons, avant de sortir du GD le long du *stratum lucidum* pour contacter les dendrites des CP de CA3 (Fig. 1.3.)

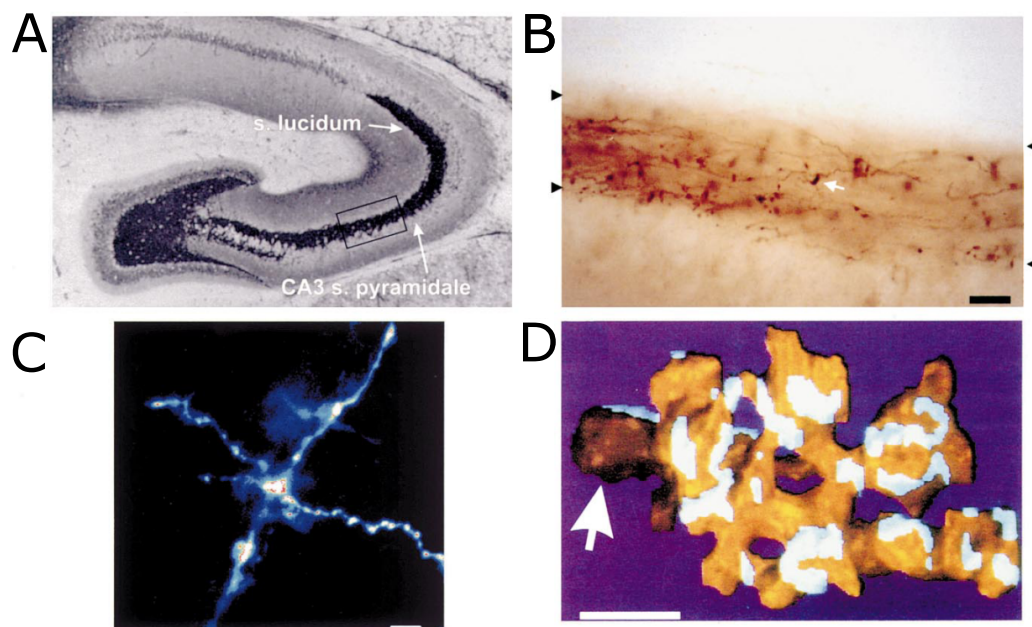


Fig. 1.3.: Anatomie des fm. (A) Section transversale d'hippocampe colorée avec la méthode de Timm pour le Zinc. La bande noire correspond au fm dans le *stratum lucidum* et les CP de CA3 se situent dans le *stratum pyramidale*. (B) Exemple de fm marquées à la biocytine dans le CA3b. Le rectangle noir en (A) correspond à la zone représentée en (B). La flèche blanche indique un bouton géant de fm. Les flèches noires indiquent les limites du *stratum lucidum*. (C) Exemple d'un bouton géant de fm, marqué avec du Dil, un colorant fluorescent, et scanné au microscope confocal. Les fibres s'étendant vers la gauche et la droite correspondent à des filopodes. (D) Reconstruction électromicrographique en série d'une seule excroissance épineuse d'une CP de CA3. Ces épines dendritiques forment les structures post-synaptiques des contacts avec les fm. Les zones bleues claires correspondent aux densités post-synaptiques. 12 têtes sont présentes sur cette épine. Barres d'échelles = 20 μm (B), 5 μm (C), 1 μm (D). Depuis Henze et al. 2000

Les fm contactent également les interneurons dans CA3. Le nombre de synapses sur les interneurons est beaucoup plus élevé que celui sur les CP de CA3, suggérant que l'activation des fm pourrait entraîner une activation plus importante des interneurons que des CP. De ce fait, l'activation des fm pourrait résulter en une nette inhibition de CA3 plutôt qu'en une excitation (Acsady et al. 1998). Il est également probable qu'en fonction de la fréquence de décharge de CG, seules certaines populations de CP soient activées, et que l'activité des autres CP soit simultanément inhibée, ce qui augmenterait le ratio signal/bruit dans le réseau et permettrait de sélectionner les CP devant être activées (Henze et al. 2002, Zucca et al. 2017).

Les synapses formées sur les dendrites des CP sont appelées "boutons géants" et font de 4 à 10 μm de diamètre (Chicurel M E 1992). Ils peuvent soit se former *en passant*, ou bien être rattaché à l'axone par un court embranchement. (Acsady et al. 1998, Amaral and Dent 1981). Chaque bouton contient des milliers de petites vésicules claires, ainsi que des vésicules plus grandes et denses. Le corps principal du bouton pré-synaptique enveloppe une large épine post-synaptique présentant plusieurs têtes, nommées excroissances épineuses. Une des caractéristiques les plus remarquables de ces synapses est la présence de plusieurs zones actives pré-synaptiques faisant face à plusieurs densités post-synaptiques. Le plus grand nombre de zones actives pour un seul

bouton a été reporté à 35 (Chicurel M E 1992). Les synapses formées par les fm étant proches du soma des CP, et le nombre de zones actives étant important comparé à des synapses classiques, l'activation des fm peut potentiellement avoir un fort impact sur les CP post-synaptiques, et ce malgré le faible nombre de boutons géants par CP (Stuart et al. 1997). De plus, les CG du GD se renouvellent tout au long de la vie de l'animal, phénomène appelé neurogenèse adulte. Les CG nouvellement formées doivent alors s'intégrer dans le circuit hippocampique et contacter les CP et les interneurons, soumettant le réseau à un remodelage continu. En fonction des expériences vécues par l'animal, le taux de nouvelles CG intégrées dans le réseau varie. Certaines expériences, comme l'enrichissement de l'environnement de l'animal, augmente le taux de neurogenèse (Kempermann et al. 1997, Galimberti et al. 2006).

Le neurotransmetteur principal libéré par les fm est le glutamate, activant post-synaptiquement des récepteurs de type AMPA (rAMPA, pour alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate), kaïnate, mais aussi NMDA (rNMDA, pour acide N-méthyl-D-aspartique (Jonas et al. 1993)). Les récepteurs post-synaptiques de type kaïnate peuvent être activés à la suite de courts bursts d'activité à haute fréquence des fm, et peuvent même amplifier la transmission des potentiels d'actions entre les fm et les CP (Castillo et al. 1997, Vignes and Collingridge 1997, Sachidhanandam et al. 2009). La réponse évoquée par l'activation de ces récepteurs au niveau post-synaptique a une cinétique lente et induit donc une excitation prolongée des CP de CA3 (Pinheiro et al. 2013). En plus de libérer du glutamate, il a été montré que les fm libèrent également différents peptides, comme l'adénosine mais aussi des ions tel que le zinc. Le zinc peut agir comme un neuromodulateur classique, inhibant les récepteurs NMDA (rNMDA) post-synaptiques (Vergnano et al. 2014). L'adénosine est elle impliquée dans la potentialisation à long terme des courants synaptiques médiés par les rNMDA également (Rebola et al. 2008).

Propriétés synaptiques. Les paramètres définissant l'efficacité synaptique sont (i) le nombre de site de libération (N), (ii) la taille quantale (q), et (iii) la probabilité de libération (p). Pour estimer ces paramètres à la synapse fm-CP, l'analyse de fluctuation à probabilité multiple a été utilisée (Silver et al. 1998, Lanore et al. 2012). Les paramètres quantaux sont estimés à l'aide de la fluctuation des courants synaptiques mesurés pour plusieurs probabilités de libération imposées à la même projection axonale. Cette méthode permet d'estimer N, q et p même lorsque la probabilité de libération et la taille quantale sont non-uniformes. Pour pouvoir imposer différentes probabilités de libération, la fréquence de stimulation est graduellement augmentée, et la concentration de calcium extracellulaire modifiée. Chez des souris à P21, $N = 31,3 \pm 5,6$, $q = 49 \pm 7$ pA, et $p < 0,01$ (Lanore et al. 2012). Cette probabilité de libération faible (elle est estimée à 0.34 - 0.5 à la synapse fm-interneurons (Lawrence et al. 2004)) implique que lorsque la fréquence de décharge des CG présynaptiques est faible (< 0.1 Hz), les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) évoqués sont de faible amplitude et ne suffisent pas à entraîner la décharge d'un potentiel d'action dans les CP.

Plasticité à court-terme. Malgré cette faible efficacité, la stimulation en courts bursts d'une seule fm est capable d'entraîner la génération d'un potentiel d'action post-synaptique dans la CP de CA3, en tranches *in vitro* (Sachidhanandam et al. 2009) et chez le rat anesthésié *in vivo* (Henze et al. 2002). Ces propriétés de "détonation" sont dues à un répertoire de plasticités pré-synaptiques à court-terme dès lors que les fm sont activées de manière répétée, et ce grâce au

nombre important de sites de libération, au grand nombre de vésicules disponibles à être libérées, et à la présence de libération multivésiculaire (Hallermann et al. 2003, Chamberland et al. 2014). En effet, malgré le nombre élevé d'échecs de transmissions lors de stimulations à faible fréquence (Salin et al. 1996), cette synapse se distingue des autres synapses du système nerveux par la présence d'une importante facilitation lors d'une stimulation en paire (deux stimulations rapprochées dans le temps par un court intervalle, typiquement entre 10 et 50 ms) des fm. Dans la plupart des cas, la réponse évoquée par la deuxième stimulation a une amplitude plus de 3 fois supérieure à celle évoquée par la première stimulation (Fig. 1.4 panel A) (Pour revue, voir Nicoll and Schmitz 2005). Cette forme de facilitation provient d'une libération plus importante de glutamate lors de la deuxième stimulation due à la présence de calcium résiduel dans le bouton pré-synaptique. Une autre forme de facilitation que la synapse fm-CP de CA3 possède, est la facilitation en fréquence, pendant laquelle une augmentation modérée de la fréquence de stimulation des fm (de 0,05 Hz à 1 Hz par exemple), entraîne une forte augmentation de l'amplitude du courant évoqué post-synaptiquement. Ces types de facilitations ont été observées et mises en évidence *in vitro* (Salin et al. 1996, Pinheiro et al. 2007) et plus récemment *in vivo* chez l'animal anesthésié (Zucca et al. 2017) (Fig. 1.4). Ces formes de plasticités seraient dues à

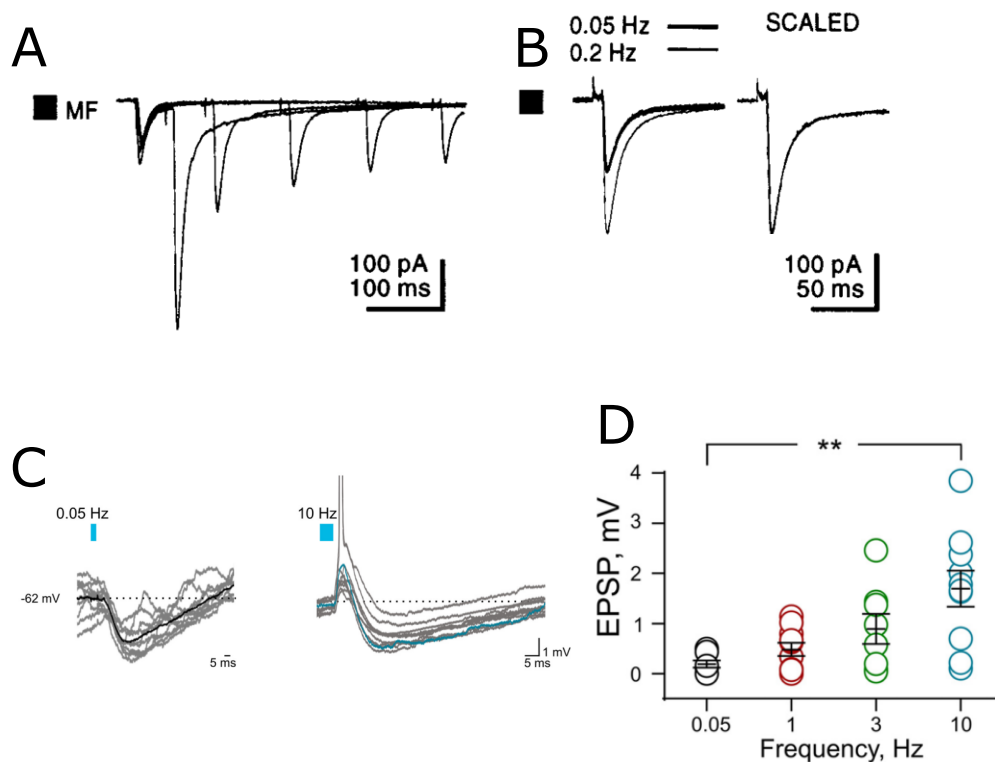


Fig. 1.4.: Plasticités à court-terme à la synapse fibre-mousse-CP de CA3. (A) Facilitations en paire et (B) en fréquence *in vitro* sur des tranches d'hippocampe. Depuis Salin et al. 1996. (C) Facilitation en fréquence *in vivo* chez l'animal anesthésié. Potentiels synaptiques évoqués lors de la stimulation des CG à 0.05 Hz et 10 Hz. Les traces moyennes sont superposées. (D) Quantification de la facilitation en fréquence des PPSE évoqués par la stimulation optogénétique des CG *in vivo*. Depuis Zucca et al. 2017.

la présence et l'activation de différents récepteurs. Présynaptiquement, les fm présentent une activation tonique des protéines inhibitrices Gi/o réduisant l'efficacité de transmission synaptique

lors d'une seule stimulation et contribuant donc à la faible probabilité de libération en conditions basales. Cette activation se ferait par l'activation tonique des récepteurs présynaptique A1 à l'adénosine (Fedele et al. 2005). Cette hypothèse a cependant été remise en cause par une étude démontrant peu d'effet de l'adénosine sur la probabilité de libération (Kukley 2005). De plus, des récepteurs du glutamate présynaptiques métabotropiques mGluR (Kamiya and Ozawa 1999, Toth et al. 2000) et kaïnate (Pinheiro et al. 2007, Sachidhanandam et al. 2009, Lanore et al. 2012) sont activés par le glutamate libéré. Les récepteurs présynaptiques de type kaïnate peuvent être activés par un seul événement de libération au niveau des fm (Pinheiro et al. 2007).

Plasticité à long-terme. La synapse fm-CP présente aussi des formes pré-synaptiques de potentialisation à long-terme (PLT) et de dépression à long-terme (DLT). Les deux sont induites par une modification de la libération de glutamate et sont indépendantes de l'activation des rNMDA. En tranches, l'induction de la PLT dépend de la production d'AMP cyclique (Bischofberger et al. 2006 Fernandes et al. 2015).

Récemment, des formes de plasticités post-synaptiques ont également été mises en évidence à la synapse fm-CP. Ces synapses n'expriment qu'un niveau faible de rNMDA post-synaptiques, ce qui explique l'absence de PLT conventionnelle des récepteurs AMPA dépendante des rNMDA (Nicoll and Schmitz 2005). Cependant, les courants post-synaptiques excitateurs (CPSE) médiés par l'activation des rNMDA peuvent être potentialisés grâce à des patterns d'activation pré-synaptiques spécifiques (Kwon and Castillo 2008 Rebola et al. 2008). Cette PLT facilite la transmission synaptique, permet un phénomène de métaplasticité en rendant la synapse compétente à la PLT conventionnelle des rAMPA dépendante des rNMDA, et contrôle une forme de plasticité qui dépend de la coïncidence de potentiels d'actions pré- et post-synaptiques (Rebola et al. 2011). L'induction de la DLT à la fm nécessite l'activation des récepteurs mGluR2 pré-synaptiques et est exprimée pré-synaptiquement par une diminution de la libération de neurotransmetteur (Kobayashi et al. 1996 Yokoi et al. 1996). L'activation de mGluR2 n'est pas suffisante et requiert une élévation de Ca^{2+} dans la terminaison pré-synaptique (Tzounopoulos et al. 1998 Kobayashi et al. 1999).

1.1.3.b. Connexions CA3-CA3

Les collatérales récurrentes des axones des CP de CA3 se ramifient, pour contacter les CP voisines ainsi que des interneurones. Les modèles computationnels suggèrent que ce genre de réseau, appelé attracteur, ou autoassociatif, joue un rôle important dans le stockage et le rappel de la mémoire (voir 1.2.2.) (Kesner and Rolls 2015). La preuve physiologique de l'excitation synaptique récurrente entre les cellules principales de CA3 date de 1986 quand Richard Miles et Robert Wong enregistrent des EPSPs évoqués par la stimulation des récurrentes de CA3, avec une amplitude unitaire de 1 à 2 mV (Miles and Wong 1986). En 1983, les mêmes auteurs ont montré que la stimulation d'une seule CP de CA3 est capable d'entraîner la décharge synchronisée en burst d'une population de CP initiant de ce fait des décharges interictales propres aux crises

d'épilepsies (Miles and Wong 1983).

Les axones de CA3 se ramifient dans les *stratum oriens* et *radiatum* et contactent les dendrites apicales et basales d'autres CP ainsi que d'interneurones. Typiquement, ils se divisent en 5 à 10 collatérales, projetant dans différentes directions mais retournant rarement à leur neurone parent. Les projections longitudinales d'axone unique peuvent s'étendre sur 70% de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe chez le rongeur (Sik et al. 1993, Li et al. 1994). La longueur totale d'un axone de CP est estimée entre 150 et 300 μ m chez le rat avec environ 30% des ramifications à l'intérieur de CA3 (Ishizuka et al. 1990, Li et al. 1994). Des terminaisons synaptiques sont présentes le long de cet axone et une CP forme entre 30 000 et 60 000 contacts. Ces contacts se forment à la même fréquence sur les CP et les interneurones. Les synapses formées, contrairement aux boutons géants des fm, ne possèdent en général qu'une seule zone active. Les vésicules présentes dans ces terminaisons sont positives à VGLUT1 et VGLUT2 (Herzog et al. 2006) et donc contiennent et libèrent du glutamate. Les études par microscopie électronique de ces terminaisons n'ont pas révélé de vésicules synaptiques denses pouvant contenir des peptides ou autres co-transmetteurs. Le glutamate libéré d'une terminaison pré-synaptique se fixe aux récepteurs post-synaptiques. Le nombre de ces récepteurs par site a été estimé en utilisant des techniques physiologiques, d'imagerie et d'anatomie. Les post-synapses contiennent toutes des rNMDA (Takumi et al. 1999), alors que seulement 30% d'entre elles contiennent des rAMPA (Nusser et al. 1998, Takumi et al. 1999, Nimchinsky 2004).

Propriétés synaptiques. Des enregistrements effectués sur tranches aiguës suggèrent qu'une cellule pyramidale excite 2 à 3% des cibles potentielles dans une tranche (Miles and Wong 1986, Miles and Wong 1987). Plus récemment, une étude ayant réussi à enregistrer jusqu'à 8 cellules pyramidales simultanément (Guzman et al. 2016) n'a rapporté qu'une probabilité de connexion de 0.92%. Cependant, ces connexions semblent largement non-aléatoires, étant donné la présence de motifs aux multiples connexions supérieures à ce qu'il faudrait observer en cas de contacts aléatoires. En effet, les fréquences de connexions réciproques, triples convergentes, triples divergentes, et de chaînes réciproques sont 6.5, 2.9, 6.3, et 3.4 fois respectivement plus importantes qu'elles ne devraient l'être si elles se formaient de manière aléatoire. De plus, le nombre de contacts synaptiques (1 à 2) et de sites fonctionnels de libération (3.2 ± 0.8) par connexion CP-CP est faible. Cependant, la probabilité de libération (0.37 ± 0.04) est plutôt élevée. L'efficacité de ces connexions est donc élevée malgré leur faible nombre, et de ce fait la décharge simultanée d'un petit nombre de cellules est suffisant pour engendrer un potentiel d'action dans une cellule post-synaptique. Les auteurs proposent différents mécanismes pouvant être à l'origine de ces motifs de connectivité : ils pourraient (i) se former durant le développement, en connectant des groupes de cellules sœurs (Deguchi et al. 2011, Yu et al. 2009), (ii) apparaître à la suite de plasticité structurale dans des ensemble de neurones actifs en synchronie (Mishra et al. 2016, Engert and Bonhoeffer 1999), ou bien (iii) correspondre à un ensemble de cellules post-synaptiques contactés par le même axone d'une fm qui entraînerait une plasticité synaptique dans cet ensemble de CP (Henze et al. 2002, Vyleta and Jonas 2014), ou d'une manière similaire être contactées par les mêmes axones provenant du CE.

Plasticité à court terme. Les propriétés de plasticité à court terme aux synapses CP-CP de CA3 ont été étudiées en tranches organotypiques, préparations favorisant les connexions synaptiques

entre les neurones, ce qui permet d'enregistrer en pair les neurones pré- et post-synaptiques et d'étudier leurs propriétés synaptiques et de plasticité (Debanne et al. 2008). Elles ont également été explorées en tranches aiguës *in vitro* (Viana Da Silva et al. 2016). Aux récurrentes de CA3, la stimulation d'une cellule pré-synaptique répétée à un intervalle de temps court (50 ms) peut entraîner une facilitation ou une dépression à court terme dans la cellule post-synaptique (Debanne et al. 2008 Pavlidis and Madison 1999). En effet, l'amplitude du deuxième CPSE dépend de l'amplitude du premier : si le premier est large, le deuxième aura tendance à être plus petit, et inversement.

Plasticité à long terme. Une forme de plasticité à long-terme présente aux synapses récurrentes dépend du moment de décharge de potentiels d'action pré- et post-synaptiques. En anglais, cette plasticité associative s'appelle "Spike Timing Dependent Plasticity" (STDP) (Song et al. 2000). Le signe et le degré de modification synaptique entraîné par la décharge répétée des neurones pré- et post-synaptique dépend de leur timing relatif. En cultures, lorsqu'un potentiel d'action pré-synaptique est couplé de manière répétée à une dépolarisation post-synaptique de 240 ms évoquant 5 à 12 potentiels d'action post-synaptiques, une PLT dépendante de l'activation des rNMDA est induite à cette synapse. Au contraire, une DLT est entraînée lorsqu'un potentiel d'action pré-synaptique n'est provoqué qu'après un certain délai suivant la dépolarisation post-synaptique ou la décharge d'un seul potentiel d'action post-synaptique (Debanne et al. 1998, Montgomery et al. 2001). Cependant, cette forme asymétrique de plasticité ne semble pas être présente dans un réseau neuronal intact (Mishra et al. 2016). En effet, sur des tranches aiguës d'hippocampe de rats à P21-P29, le couplage de PPSE et de potentiels d'action induit une PLT quelque soit l'ordre temporel de ce couplage. Contrairement aux expériences en culture précédemment évoquées, il semblerait donc que la courbe de STDP aux synapses CP-CP de CA3 soit symétrique. Cette induction est dépendante de l'activation des rNMDA ainsi que des récepteurs calciques de type L. La différence observée entre les deux préparations pourrait être d'origine développementale, car les cellules en cultures sont généralement moins développées que celles retrouvées chez le rongeur à P21-P29.

1.1.3.c. Sorties : les collatérales de Schaffer

Les collatérales de Schaffer, initialement décrites par le neuroscientifique Hongrois Károly Schaffer, désignent les projections axonales de CA3 à CA1 (Szirmai et al. 2012) (Fig. 1.5).

Toutes les CP de CA3 donnent naissance à des projections divergentes se propageant dans toutes les portions de l'hippocampe. Malgré la différente terminologie entre les récurrentes de CA3 et les collatérales de Schaffer, ces deux projections transmettent potentiellement les mêmes informations. Les collatérales de Schaffer démontrent un pattern de projection non-homogène le long des différents axes hippocampiques qui dépend de la localisation de la CP d'origine (Ishizuka et al. 1990). Les collatérales de Schaffer sont généralement décrites comme innervant uniquement le *stratum radiatum*. Cependant, les *stratum radiatum* et *oriens* de CA1

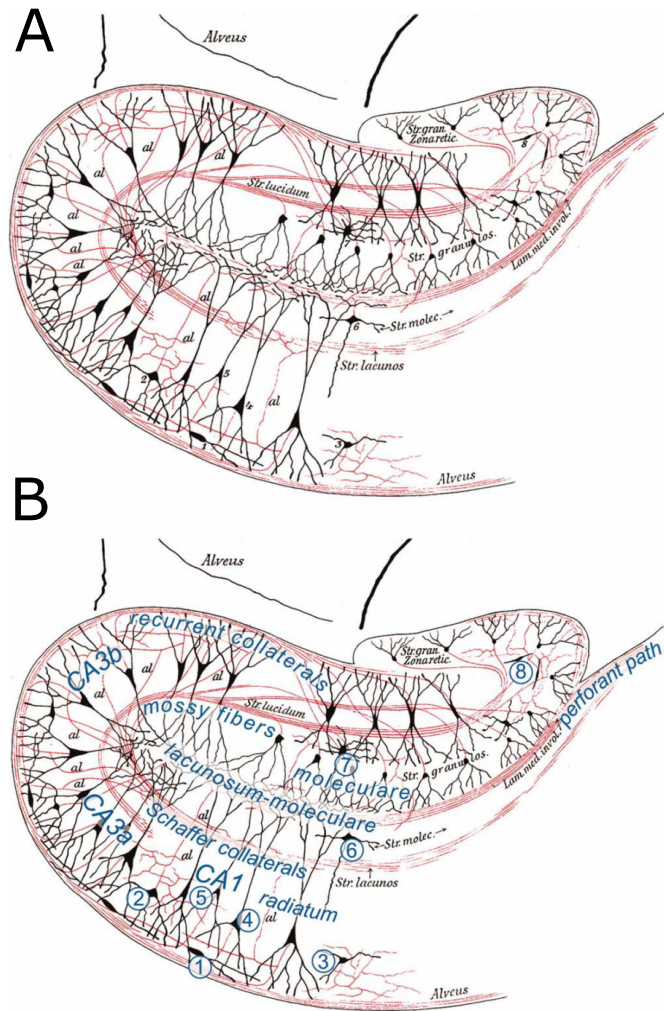


Fig. 1.5.: Les collatérales de Schaffer. (A) Dessin original de Schaffer des cellules principales et de la structure basique de l'hippocampe de lapin (1892). 1, cellule nerveuse fusiforme; 2, cellule nerveuse polymorphe; 3, cellule nerveuse de Golgi; 4, cellule pyramidale géante; 5, petite cellule pyramidale; 6, cellule nerveuse de la couche moléculaire; al, collatérales ascendantes des cellules pyramidales et de certaines cellules polymorphiques qui passent dans le *stratum lacunosum*; 7, cellule nerveuse polygonale du *fascia dentate*; 8, cellule fusiforme au même endroit. (B) Même figure avec les nomenclatures anatomiques utilisées aujourd'hui. Depuis Szirmai et al. 2012

sont densément innervés par les axones de CA3. Les CP de CA3 se trouvant près du gyrus denté (dans le CA3c), projettent généralement vers des niveaux de CA1 se trouvant plus septalement. Celles se trouvant plus proche de CA1 (CA3a), en revanche, projettent plus densément vers le CA1 temporal. A un niveau septotemporal donné, une CP de CA3c (distale) contactera plus probablement une CP de CA1 proximale, alors qu'une CP de CA3a (proximale) contactera plus probablement une CP de CA1 distale. On ne connaît pas exactement le nombre de synapses qu'une seule CP de CA3 fait sur une cellule de CA1. Les estimations expérimentales donnent des nombres faibles : 2 à 4 synapses, jusqu'à 10 maximum (Sorra and Harris 1993, Andersen et al. 1996). En plus des CP de CA1, les collatérales de Schaffer contactent également des interneurons de CA1 qui contactent ensuite les cellules principales de CA1 et les inhibent (Cope et al. 2002, McBain and Fisahn 2001).

Les projections denses et homogènes qui forment les collatérales de Schaffer ont facilité l'étude de la transmission synaptique et de la plasticité, parce qu'elles sont facilement activables et les CP de CA1 facilement enregistrables. La probabilité de libération aux synapses CA3-CA1 est inférieure à 0.5 (Raastad 1995), et très variable de synapse en synapse (Hessler et al. 1993, Rosenmund et al. 1993). Lorsque deux potentiels d'actions pré-synaptiques arrivent à un intervalle de temps court (typiquement quelques dizaines de ms), on observe une facilitation du CPSE évoqué post-synaptiquement (Andersen et al. 1996). La présence de la PLT à ces synapses a été mise en évidence *in vitro* en 1975 (Schwartzkroin and Wester 1975). Cette forme de PLT est la forme la plus classique de plasticité étudiée : la stimulation tétanique des collatérales de Schaffer induit une augmentation rapide et persistante des réponses synaptiques, enregistrées extra ou intra-cellulairement. Cette PLT peut durer plusieurs heures, jours, semaines, chez des animaux implantés avec des électrodes, avant de généralement retourner à un niveau de base. Cette PLT est dépendante de l'activation des rNMDA et de l'élévation de la concentration de calcium post-synaptique (Collingridge et al. 1983). Ces synapses peuvent également exprimer une DLT à la suite d'une longue stimulation à faible fréquence (plusieurs centaines de stimulation à 1 Hz). Cette DLT est également dépendante de l'activation des rNMDA (Dudek and Bear 1992).

1.1.4 Entrées du cortex entorhinal

Le CE joue un rôle important dans le parcours des informations à l'intérieur de la formation hippocampique. C'est la principale porte d'entrée des informations sensorielles provenant de différentes aires corticales, qui sont ensuite envoyées au gyrus denté et à l'hippocampe. C'est aussi la porte de sortie de l'information traitée par les autres régions de la formation hippocampique, que le CE renvoie au néocortex. Le CE est composé de 6 couches : 4 couches cellulaires (II, III, V, VI), et 2 couches acellulaires (I, IV). Il est divisé en deux sous-régions :

- le cortex entorhinal médian (CEM)
- le cortex entorhinal latéral (CEL)

Le CEM et CEL projettent tous les deux au GD, à l'hippocampe et au subiculum. La couche cellulaire II est constituée de cellules appelées "stellate" et de cellules pyramidales, qui projettent au GD et à CA3 (Witter et al. 1989). Il est probable que les projections au GD et à CA3 proviennent

de collatérales du même neurone (Tamamaki and Nojyo 1993). La couche III, constituée principalement de cellules pyramidales, projette à CA1 et au subiculum. Les projections du CEL à CA3 s'arrêtent à la moitié extérieure du *stratum lacunosum-moleculare* alors que celles provenant du CEM en innervent la moitié intérieure (Witter 2007). Les CP de CA3c reçoivent moins d'entrées du CE en comparaison avec les CP de CA3 plus distales. En effet, les dendrites apicales de CA3b et CA3a sont plus largement connectées par le CE (Ishizuka et al. 1990 Li et al. 1994).

1.1.5 Conservation et divergence au cours de l'évolution

Grossièrement, l'anatomie de l'hippocampe chez le rat, le singe et l'humain sont fortement similaires (Figs. 1.6, 1.7).

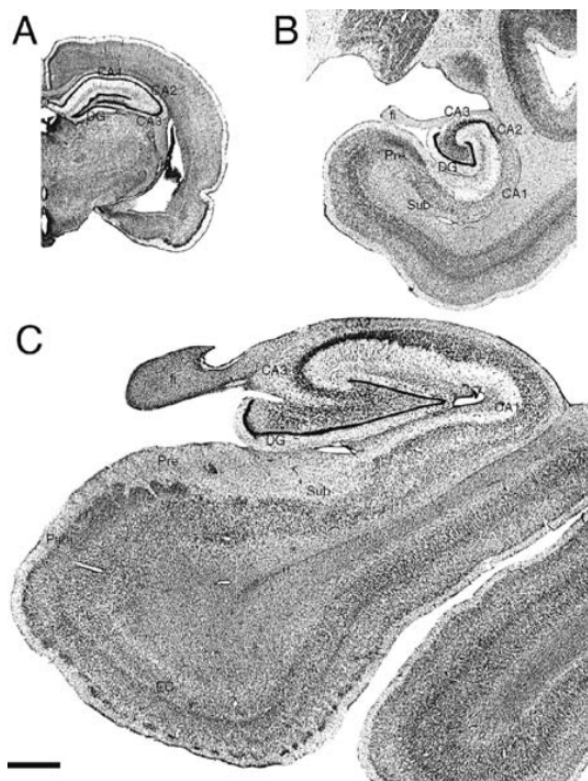


Fig. 1.6.: Formation hippocampique chez différentes espèces. Formation hippocampique (A) de rat (B) de singe (C) d'homme colorés avec la méthode de Nissl, présentés au même grossissement. Barre d'échelle = 2 mm. Depuis Andersen et al. 2009.

La couche de cellules granulaires dense est évidente chez les trois espèces, ainsi que la lamination, du GD au CE. Cependant, il existe un certain nombre de différences entre la formation hippocampique de ces trois espèces. Le CE et CA1 sont beaucoup plus volumineux chez le primate, et le CE a beaucoup plus de subdivisions chez le singe et l'homme que chez le rat. De plus, l'organisation laminaire est plus distincte chez le primate. Le nombre de neurones présents dans chaque subdivision de la formation hippocampique a souvent été compté, mais rarement des mêmes auteurs ont comparé la formation hippocampique chez le rat, le singe et l'homme

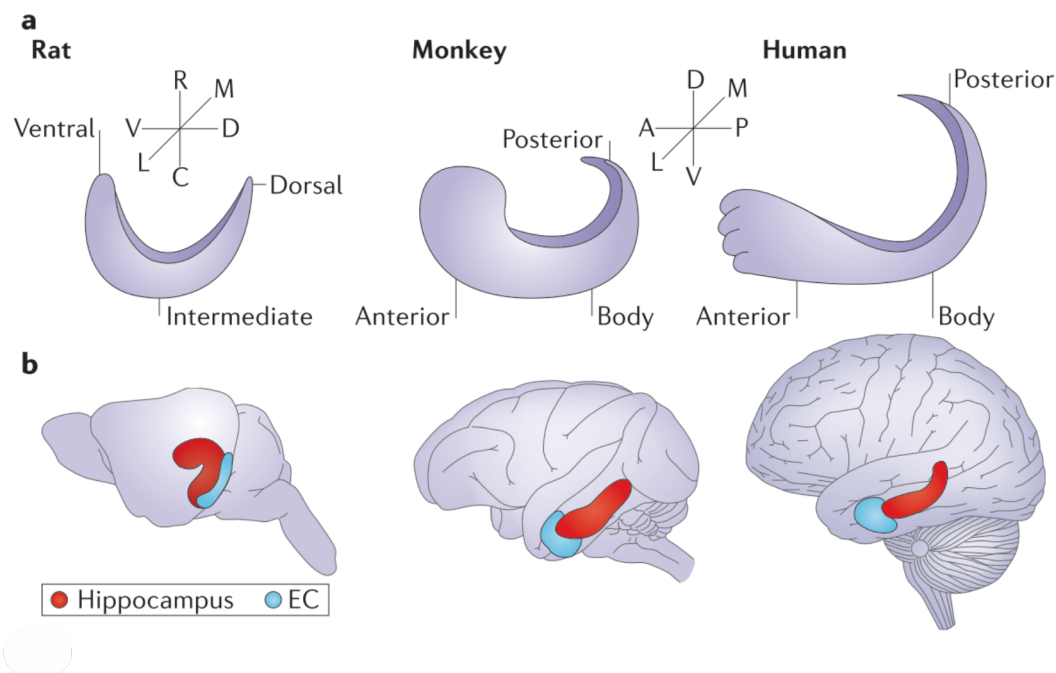


Fig. 1.7.: Comparaison de la formation hippocampique chez différentes espèces. (a) Illustration de l'orientation de l'hippocampe chez le rat, le macaque et l'homme. L'axe longitudinal est décrit comme ventrodorsal chez les rongeurs et antéropostérieur chez les primates. Une rotation de 90° est nécessaire pour que l'hippocampe de rat ait la même orientation que celle des primates. (b). La position de l'hippocampe (rouge) dans le cerveau du rat, macaque et de l'homme, avec le cortex entorhinal en bleu. A, Antérieur; C, caudal; D, dorsal; DG, gyrus denté; L, latéral; M, médial; P, postérieur; R, rostral; V, ventral. Adapté de Strange et al. 2014.

(Andersen et al. 2009). Dans le GD, il y a approximativement 10 fois plus de CG chez le singe par rapport à chez le rat, et 15 fois plus chez l'homme. CA1 comporte seulement 3 fois plus de CP chez le singe que chez le rat, contre 35 fois plus chez l'homme que chez le rat. La couche polymorphique du GD est relativement plus petite chez le singe et chez l'homme, et la plupart de son territoire, qui se situe entre les lames des CG, est occupé par des CP de CA3, qui contactent CA1 via les collatérales de Schaffer. Une des différences majeures entre le rat et le singe réside dans l'organisation des connexions commissurales (Amaral et al. 1984, Demeter et al. 1985). Chez le rat, comme mentionné précédemment, il existe des projections des CP de CA3 aux CA3 et CA1 controlatéraux. Chez le singe, ces connexions sont absentes. Seule la portion la plus rostrale chez le singe présente des projections controlatérales qui sont limitées à la même région (CA3-CA3). Étant donné le peu de données disponibles chez l'homme aujourd'hui, il est important de noter que les connexions neuroanatomiques décrites chez le rat et le singe ne sont pas toutes connues pour être applicables chez l'homme.

Concernant le rôle de la formation hippocampique chez l'homme, il existe aujourd'hui un consensus sur son rôle dans la mémoire épisodique (Squire and Morgan 1991, Vargha-Khadem et al. 1997, Eichenbaum 2001). Son rôle dans la navigation a également été démontré chez l'homme (Maguire et al. 1996b, Maguire et al. 1996a, Vargha-Khadem et al. 1997, Maguire et al. 1998, Abrahams et al. 1999, Spiers et al. 2001). Les déficits de mémoire spatiale et épisodique sont souvent les premiers symptômes observés chez les patients présentant des

lésions des lobes médiaux temporaux dues à la progression de certaines maladies telles que la maladie d'Alzheimer. L'hippocampe est notamment impliqué dans l'acquisition de nouveaux souvenirs (Scoville and Milner 1957), avec la mémoire visuo-spatiale associée à l'hippocampe droit, et la mémoire verbale ou narrative associée à l'hippocampe gauche (Frisk and Milner 1990). De ce fait, malgré certaines différences neuroanatomiques, les rôles de l'hippocampe semblent avoir été précisément conservés au cours de l'évolution, des rongeurs à l'homme.

1.2 CA3 : physiologie et fonctions - intégration des informations spatiales et contextuelles

L'architecture des circuits de CA3 a inspiré les modèles computationnels de la mémoire parce qu'elle semble adaptée pour le stockage et la récupération de souvenirs "associatifs". Les souvenirs associatifs sont ceux qui permettent à un individu d'apprendre et de se rappeler de la relation entre différents éléments qui ne sont pas liés. Les données suggèrent que CA3 permet l'encodage d'informations spatiales dans une mémoire de courte durée (de quelques secondes à quelques minutes). De plus, les informations reçues par le GD semblent jouer un rôle dans un processus appelé "séparation de pattern", c'est à dire la capacité à dissocier deux souvenirs similaires, et les informations reçues par le CE et les connexions CA3-CA3 seraient elles importantes pour la "complétion de pattern", qui désigne la capacité à compléter des informations manquantes pour le rappel d'un souvenir incomplet. En plus de la complétion de pattern, le réseau auto-associatif formé par les connexions CA3-CA3 serait important pour le stockage initial rapide des souvenirs (Fig. 1.8).

1.2.1 Mémoire spatiale : l'hippocampe comme carte cognitive

1.2.1.a. Découverte des cellules de lieu

L'étude du rôle de l'hippocampe a connu un développement important grâce à l'utilisation de microélectrodes implantées pour enregistrer l'activité de neurones uniques (Hirano et al. 1970, O'Keefe and Dostrovsky 1971, Ranck 1973). Ces expériences ont permis de décrire les relations entre l'activité cellulaire et un répertoire de paramètres sensoriels et comportementaux. Un de ces paramètres - la localisation de l'animal dans son environnement - a donné naissance à la théorie de la carte cognitive, qui a entraîné depuis de nombreuses recherches sur les fonctions spatiales de l'hippocampe (O'Keefe and Dostrovsky 1971). Les enregistrements de neurones individuels de l'hippocampe chez le rat libre de ses mouvements date du début des années 1970, avec les travaux de Ranck (Ranck 1973) et O'Keefe (O'Keefe and Dostrovsky 1971). Les animaux se déplaçaient dans leur environnement, et effectuaient des tâches quotidiennes comme manger, boire, dormir, et chercher de la nourriture ou de l'eau. Ces expériences ont permis la mise en

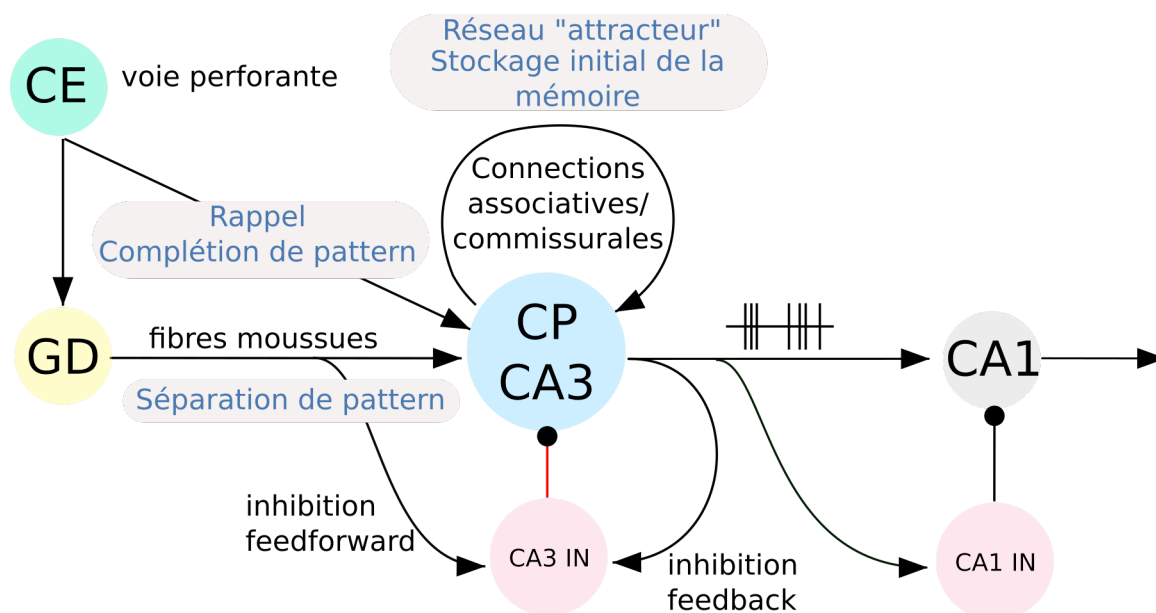


Fig. 1.8.: Les circuits de CA3 et leurs rôles dans les processus mnésiques. Les interconnexions CA3-CA3 fonctionneraient comme un réseau attracteur, dans lequel les souvenirs associatifs sont stockés et rappelés via la complétion de pattern. Les informations provenant des fm sont rares et puissantes, et participeraient à la séparation de pattern et à l'encodage rapide de la mémoire. Les connexions directes du CE seraient importantes pour le rappel d'information, spécialement lorsqu'une information incomplète est présentée. L'inhibition en feedforward contrôle finement le transfert d'information entre le GD et CA3. Les différentes boucles inhibitrices contrôlent également la génération d'oscillation. Adapté de Rebola et al. 2017

évidence des cellules de lieu : l'activité de ces cellules dépend de la localisation de l'animal dans l'environnement. Une cellule de lieu ne déchargera que lorsque l'animal se trouvera à une position particulière. Cette position à laquelle la cellule est active est appelée le "champ" de la cellule de lieu (Fig. 1.9). Les premières cellules de lieu à avoir été enregistrées se situaient dans CA1. Depuis, elles ont été mises en évidence dans la plupart des régions de la formation hippocampique (Jung and McNaughton 1993, Jung et al. 1994, Leutgeb et al. 2007, Kjelstrup et al. 2008), et notamment CA3 (Fig. 1.9, Olton et al. 1978, Best and Ranck 1982, Lu et al. 2015), mais la façon dont les environnements et les expériences sont encodées dans le circuit pourraient être influencées par les différences dans la structure des réseaux de CA3 et CA1.

1.2.1.b. Propriétés des cellules de lieu

Les cellules de lieu se retrouvant dans toutes les sous-régions de l'hippocampe, leurs propriétés sont-elles héritées par CA1 du GD et CA3 qui traiteraient séquentiellement les informations, ou bien par les projections du CE à chaque sous-région qui entraîneraient la mise en place des champs à l'aide d'algorithmes similaires dans le GD, CA3 et CA1 ? Par opposition à un mode séquentiel de traitement de l'information, le GD n'est pas nécessaire pour la mise en place des champs des cellules de lieu dans CA3 ni CA1 (Mcnaughton et al. 1989), et CA3 n'est pas requis pour la mise en place de ces champs dans CA1 (Mizumori et al. 1989, Brun et al. 2002,

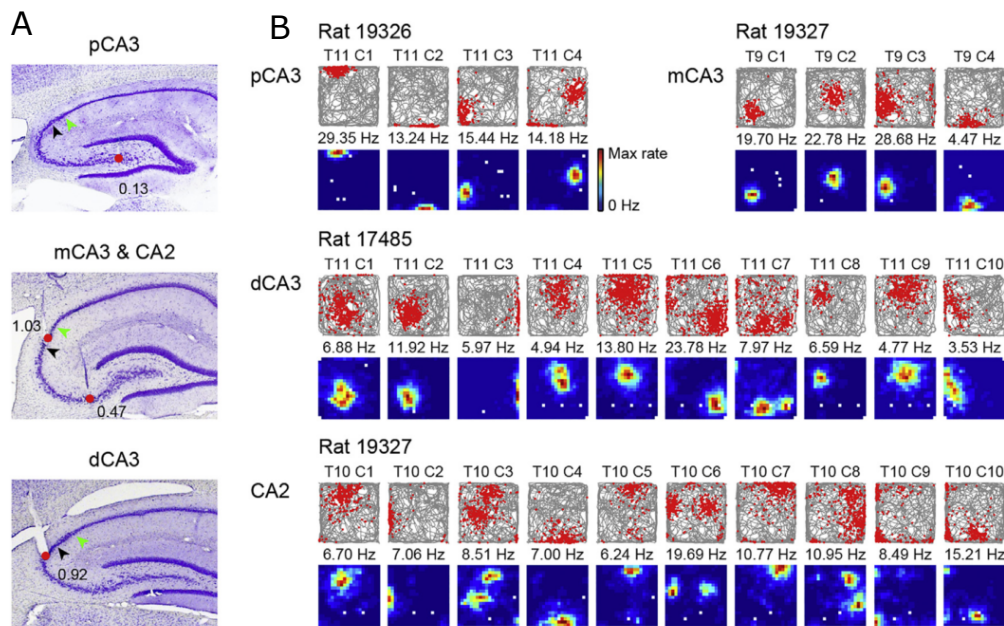


Fig. 1.9.: Sites d'enregistrements et pattern de décharge des cellules de lieux dans CA3. (A) Sections sagittales d'hippocampe colorées par la méthode de Nissl montrant les sites d'enregistrements représentatifs. La sous-région est écrite au-dessus. La position de l'enregistrement est indiquée par la flèche rouge. Le nombre proche du site d'enregistrement indique la position de l'enregistrement selon l'axe proximodistal de CA3-CA2, soit 0 la limite proximale et 1 la frontière CA3/CA2. Les frontières CA3/CA2 et CA2/CA1 sont indiquées par des flèches noires et vertes respectivement. Barre d'échelle = 1 mm. (B) Trajectoires avec la localisation des potentiels d'actions (rangée haute) et des cartes de fréquences de décharges (rangée basse) montrant les champs de ces cellules de lieu, pour jusqu'à 10 cellules enregistrées simultanément via les tétrodes visibles dans (A). La trajectoire totale de l'animal est visible en gris, et la localisation des potentiels d'action en rouge. Le code couleur des cartes de fréquences est indiquée sur la rangée supérieure. Barre d'échelle = 50 cm. D'après Lu et al. 2015

mais voir le panel B de la fig. 1.11). Ces données ont été complétées par des lésions et des enregistrements du CE (Miller and Best 1980, Barnes and McNaughton 1990, Quirk et al. 1992) suggérant la présence d'informations spatiales en dehors de l'hippocampe. Depuis, des cellules spatiales hautement sélectives ont été mises en évidence dans le CE (Fyhn 2004). Contrairement aux cellules de lieu, qui ne sont actives qu'à un seul ou peu d'endroits dans un environnement donné, les cellules du CEM déchargent spatialement mais de manière répétée, suivant un schéma de grille triangulaire (Hafting et al. 2005). Ces cellules projettent à l'hippocampe (Sargolini et al. 2006) et de ce fait pourraient permettre l'émergence des cellules de lieu en parallèle dans le GD, CA3 et CA1 (Fuhs 2006, Rolls et al. 2006, Trygve Solstad et al. 2007).

Les propriétés des cellules de CA3 et CA1 sont similaires, avec une plus large proportion de cellules déchargeant à faible fréquence ou silencieuses dans CA3 (Barnes and McNaughton 1990, Leutgeb et al. 2004). Une différence existe entre les cellules de lieu de CA3 et CA1 dans leur capacité à re-cartographier l'environnement (remapping). En effet, lorsqu'un environnement est modifié, les cellules de lieu actives dans cet environnement ont tendance à modifier leur activité ou à devenir silencieuses, phénomène appelé remapping, désignant la re-cartographie de l'environnement par les cellules de lieu. Dans une étude de 2004 (Leutgeb et al. 2004),

des cellules de lieu ont été enregistrées dans deux boîtes visuellement similaires mais à deux endroits différents. Les animaux étaient transportés passivement entre les deux pièces, mais étaient capables de voir clairement la disposition de la pièce. Les cellules de lieu de CA1 étaient plus souvent influencées par des caractéristiques communes des boîtes, alors que celles de CA3 étaient capables de clairement faire la distinction entre elles. Le remapping des cellules de lieu de CA3 permettrait donc de distinguer clairement deux environnements (Senzai and Buzsáki 2017).

1.2.2 Mémoire épisodique : où, quand, comment

1.2.2.a. Définition

La notion de mémoire épisodique a été introduite en 1972 par Endel Tulving (Tulving 1972) puis améliorée et modifiée depuis (Schacter and Tulving 1994, Tulving 2002). La mémoire épisodique correspond à la mémoire d'événement unique et/ou une séquence d'événements temporels qui constituent un épisode. À l'origine de sa définition, le contenu d'un souvenir épisodique est une représentation mentale du "quoi", "où" et "quand". Le "quoi" réfère à ce qu'il s'est passé pendant un événement, "où" au lieu, et "quand" au positionnement dans le temps de cet événement. Endel Tulving définit la mémoire épisodique comme recevant et stockant des informations concernant des épisodes ou événements datés temporellement, ainsi que les relations spatio-temporelles entre ces événements. Ce lien automatique qui se fait entre un événement et ses aspects spatio-temporels implique des contraintes neurobiologiques : ce système mnésique doit avoir un accès anatomique aux informations traitées par les différentes modalités sensorielles, et se trouver en aval des filtres attentionnels du néocortex et des mécanismes de perception des représentations des objets, et être connecté réciproquement aux systèmes de mémoire sémantique. La mémoire sémantique est la mémoire des faits, qui n'est liée à aucun contexte spatio-temporel. Les mémoires sémantique et épisodique forment la mémoire déclarative.

La définition "où-quand-comment" de la mémoire épisodique pose une seconde condition qui la sépare à nouveau de la mémoire sémantique : la nécessité du "voyage mental dans le temps" en tant que partie intégrante de la capacité à se souvenir. Lorsqu'un souvenir est rappelé, cela nécessite de "voyager" mentalement jusqu'au moment où l'événement de se souvenir a eu lieu. Il est alors facile de comprendre la difficulté d'étudier la mémoire épisodique chez l'animal, auquel il est impossible de demander explicitement de se rappeler d'un événement. Tulving (Tulving 2002) a d'ailleurs proposé que cette capacité de voyage mental dans le temps serait unique à l'homme. C'est pourquoi, lorsque l'on se réfère à la mémoire épisodique chez l'animal, on parle de mémoire "ressemblant à" la mémoire épisodique (episodic-like, Griffiths 1999). Des études ont montré que les conséquences de lésions hippocampiques sur la mémoire chez le singe et le rat, ressemblent celles observées dans des cas d'amnésie chez l'homme (Fig. 1.10, Squire et al. 1992). En effet, la formation hippocampique a été identifiée comme jouant un rôle central dans la mémoire déclarative. La perte de mémoire à la suite d'une ablation bilatérale

de l'hippocampe chez le patient H.M. a d'abord été rapportée par Scoville et Milner (Scoville and Milner 1957), démontrant que l'hippocampe est important pour la mémoire et que ce type de mémoire est indépendant d'autres fonctions cognitives. De plus, le rôle de l'hippocampe est sélectif à une fenêtre temporelle spécifique. La mémoire immédiate, qui sous-tend la capacité à répéter ou reconnaître des items de manière instantanée, est intacte chez les patients présentant des lésions hippocampiques (Corkin 1984, Squire et al. 1993). En outre, les souvenirs d'enfance ou les connaissances générales apprises tôt ne sont pas affectées non plus. Ces découvertes prouvent que l'hippocampe joue un rôle critique entre la formation initiale des souvenirs et leur stockage final quelque part ailleurs dans le cerveau. Il a été suggéré que l'hippocampe est important pour l'expression de souvenirs autobiographiques et spatiaux (Nadel and Moscovitch 1997). Cependant, il a été montré que le rôle de l'hippocampe est limité dans le temps et ce même pour des environnement spatiaux appris dans l'enfance (Teng and Squire 1999). La durée de l'engagement de l'hippocampe pourrait être influencée par des régions corticales adjacentes à l'hippocampe. En effet, des lésions de ces-dernières peuvent résulter à une perte de mémoire plus importante qu'une lésion de l'hippocampe seul (Warrington 1996, Reed and Squire 1998).

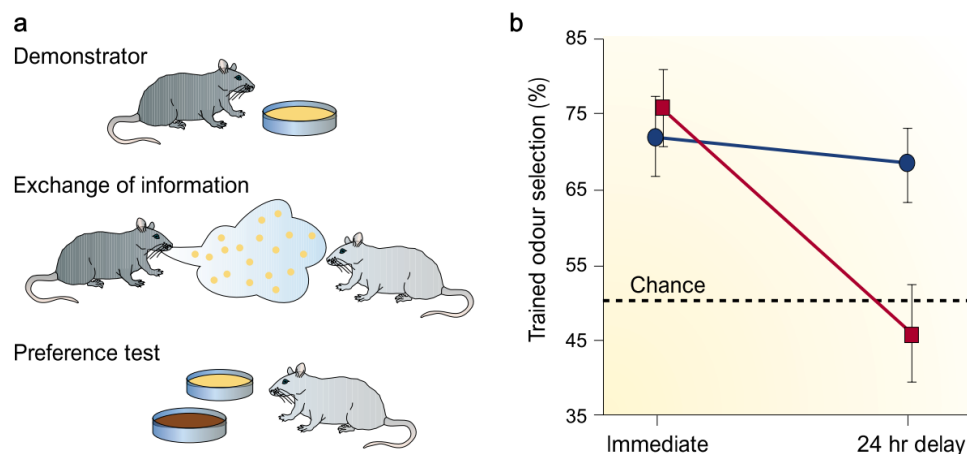


Fig. 1.10.: Transmission sociale de la préférence pour la nourriture. (A) Initialement, un rat "démonstrateur" (demonstrator) mange de la nourriture contenant une nouvelle odeur. Ensuite, pendant une interaction sociale, le démonstrateur échange des informations sur l'odeur de la nouvelle nourriture avec le rat test. Puis, le sujet a le choix entre de la nourriture ayant l'odeur de la nourriture que le rat démonstrateur a mangé, ou bien une autre odeur inconnue. (B) Résultats des tests de préférence. Les rats non-lésés (bleu) montrent une forte préférence pour l'odeur de nourriture présentée par le démonstrateur, et ce immédiatement ainsi qu'un jour après la rencontre. En revanche, des rats présentant des lésions hippocampiques (rouge) montrent une performance intacte immédiatement, mais ne choisissent plus l'odeur initialement présentée par le rat démonstrateur après un délai de 24h. Adapté de Bunsey and Eichenbaum 1995, d'après Eichenbaum 2000.

1.2.2.b. CA3 et mémoire épisodique

David Marr (Marr 1971) a proposé que l'hippocampe devrait être capable de former de simples associations rapidement grâce à ses connexions synaptiques récurrentes modifiables. Depuis,

il a été proposé plus spécifiquement que le système des collatérales de CA3 fonctionne comme un réseau attracteur qui formerait rapidement ce genre d'associations arbitraires (McNaughton and Morris 1987b). Des modèles computationnels ont suggérés que le réseau autoassociatif de CA3 permet aux associations arbitraires d'être formées et stockées dans CA3. Ensuite, les connexions récurrentes entre les collatérales de CA3 permettent le rappel efficace de l'entière représentation même après l'exposition à une représentation partielle ou dégradée (McNaughton and Morris 1987a, Hasselmo and Wyble 1997, Rolls 1996, Rolls et al. 2006). Ici, les associations arbitraires font référence aux associations entre des items indépendamment de leur type ou de leur classe (telle que l'association entre l'espace et un objet). Par exemple, une information provenant du cortex pariétal concernant la localisation d'un objet peut être associée avec une information provenant du cortex temporal concernant l'identité de l'objet (Rolls 1996). Des données supportant cette théorie viennent de l'observation que l'infusion d'APV (D,L-2-2-amino-5-phosphonovalerate), un antagoniste des rNMDA, dans le CA3 dorsal, qui altère la plasticité des projections provenant du CEM, ou de naloxone, un antagoniste opioïde, qui altère la plasticité des projections provenant du CEL, entraîne une perturbation de la détection d'une nouvelle localisation spatiale ainsi que de la détection d'un nouvel objet (Hunsaker et al. 2007). De plus, des souris adultes modifiées génétiquement, auxquelles il manque le gène codant pour les rNMDA (CA3-NR1 KO) spécifiquement dans les CP de CA3, sont moins performantes lorsqu'il s'agit de rappeler un souvenir si seules des informations spatiales partielles sont présentées. Les rNMDA de CA3 sont donc impliqués dans le rappel de souvenirs associatifs et notamment dans la complétion de pattern (Fig. 1.11 A., Nakazawa et al. 2002). Par extension, les récepteurs rNMDA étant nécessaires pour l'induction de la PLT, cette dernière pourrait donc jouer un rôle dans le rappel de souvenirs. Ces mêmes souris présentent un déficit lorsqu'il s'agit d'encoder un nouveau souvenir rapidement lors d'une expérience nouvelle (Nakazawa et al. 2003). Enfin, si la transmission synaptique entre CA3 et CA1 par les collatérales de Schaffer est inhibée, les animaux présentent un déficit (i) d'apprentissage contextuel, (ii) de rappel de mémoire basé sur la complétion de pattern, (iii) de décharge normale des cellules de lieux dans CA1 (Fig. 1.11 B., Nakashiba et al. 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que des changements rapides et plastiques dans CA3 sont essentiels dans l'encodage de nouvelles informations impliquant des associations entre des objets et des lieux, des odeurs et des lieux, ou des indices visuels et des lieux, et que les rNMDA et la plasticité synaptique associée semblent jouer un rôle important dans ces processus.

Rôles des différentes informations reçues par CA3. Les théories computationnelles suggèrent que, pour maximiser le stockage de l'information avec une interférence minimale, les réseaux associatifs tels que ceux présents dans l'hippocampe doivent réaliser deux processus, appelés séparation et complétion de pattern, compétitifs mais complémentaires (McNaughton and Morris 1987b, O'Reilly and McClelland 1994, McClelland and Goddard 1996, Hasselmo and Wyble 1997, Rolls and Treves 1998, Guzowski et al. 2004). La séparation de pattern décrit la capacité du réseau à réduire la possibilité de chevauchement d'informations similaires avant qu'elles soient stockées pour diminuer la probabilité d'interférence lors de rappel de la mémoire. La complétion de pattern est la capacité du réseau à récupérer des patterns stockés lorsque seules

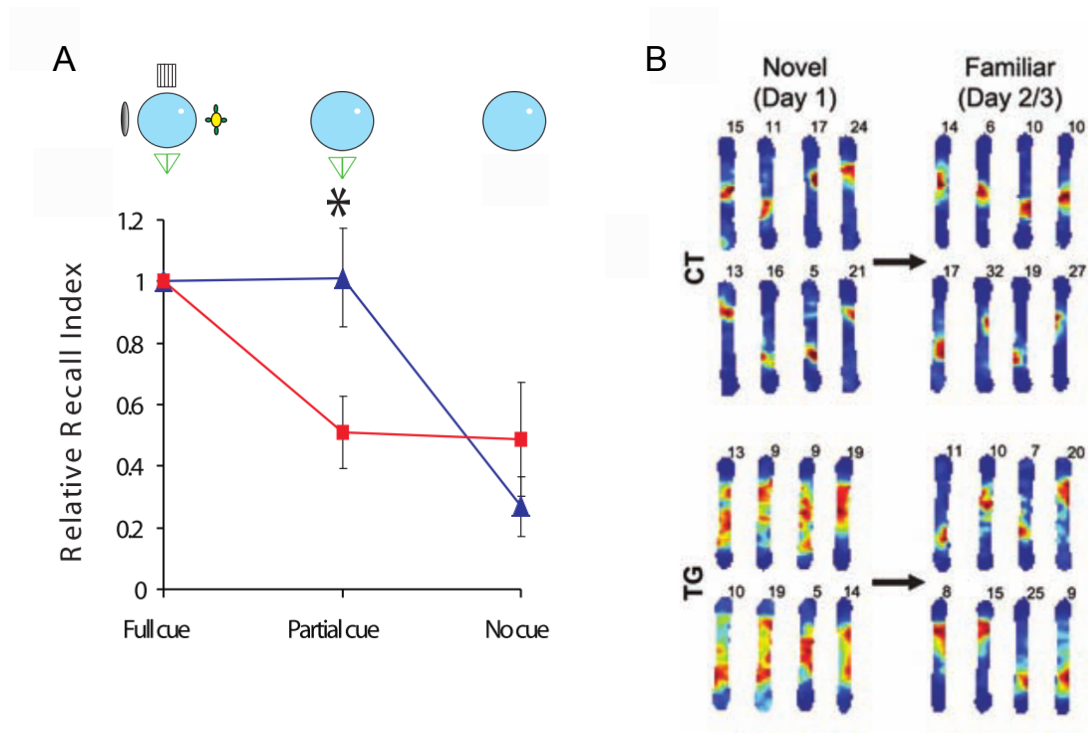


Fig. 1.11.: Rôle de CA3 dans la mémoire épisodique. (A) Performance des souris CA3-NR1 KO dans le labyrinthe aquatique de Morris et capacité de rappel sous différentes conditions. Les animaux sont entraînés à localiser une plateforme immergée dans une arène cylindrique. Des indices sont placés sur les murs de la pièce pour qu'ils se repèrent dans l'espace. Lorsque ces indices sont intacts, la performance des souris sauvages (bleu) est identique à celle des souris mutantes (rouge). En présence d'indices partiels, les souris mutantes présentent un déficit et mettent statistiquement plus de temps que les souris sauvages à retrouver la plateforme. Enfin, sans aucun indice présent, les deux groupes d'animaux ont une performance similaire. D'après (Nakazawa et al. 2002). (B) Exemples représentatifs de carte de fréquence de décharge de cellules de lieu de CA1 dans un nouvel environnement (Novel, Day1) et un environnement familier (Familiar, Day2/3) chez des souris transgéniques CA3-TETX (TG) chez lesquelles la transmission synaptique entre CA3 et CA1 est inhibée, et chez des souris sauvages (CT). Les couleurs représentent l'échelle de fréquence de décharge maximale de la cellule indiquée en haut à droite de chaque carte en Hz (bleu : min., rouge : max.). D'après (Nakashiba et al. 2008).

des informations partielles ou dégradées sont présentées. Dans beaucoup de modèles, le GD serait important pour pré-traiter les informations et permettre la séparation de pattern des informations venant du CE (Fig. 1.12). McNaughton et Morris (McNaughton and Morris 1987b), Rolls et Treves (Rolls and Treves 1998), Rolls et Kesner (Rolls et al. 2006) ont suggéré que les fm pourraient être importantes pendant l'apprentissage de nouvelles associations dans le réseau de CA3, en aidant à la séparation de pattern pour produire des représentations relativement rares et orthogonales dans CA3. Des études ont montré qu'une lésion du GD ou de CA3 perturbe l'apprentissage dans une même journée, mais que le rappel de l'information au début de la journée suivante n'est pas impacté (Lee and Kesner 2004, Jerman et al. 2006). En revanche, des lésion de la voie perforante perturbe le rappel de l'information le jour d'après, mais pas l'apprentissage le jour de la lésion (Lee and Kesner 2004). Les données existantes démontrant un lien entre transmission/plasticité synaptique et mémoire épisodique sont présentées dans le tableau 1.2.

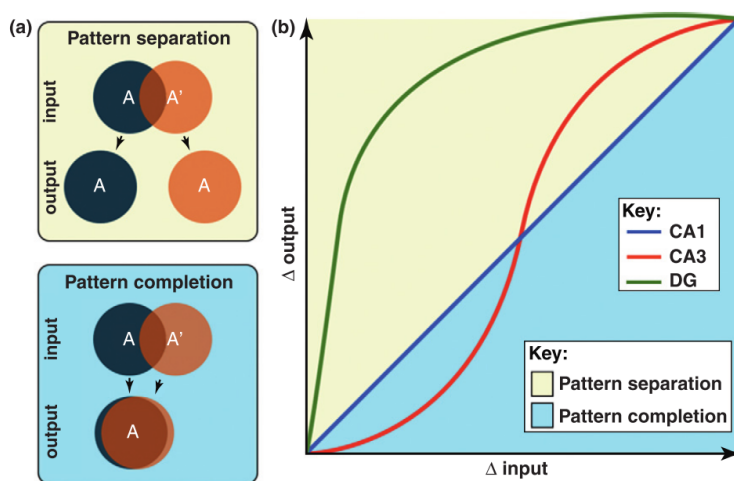


Fig. 1.12.: Représentation schématique du transfert entrée/sortie de données dans les sous-régions de l'hippocampe. (a) Représentation conceptuelle de la séparation et de la complétion de pattern. La séparation de pattern rend plus distinctes deux informations similaires (A et A'), alors que la complétion de pattern rapproche deux représentations en partie différentes. (b) Adapté de (Guzowski et al. 2004) Transformation non-linéaire dans CA3 mais pas CA1. Une courbe pour le GD a été ajoutée pour indiquer que les neurones de cette région répondent de manière non-linéaire à de petits changements dans les entrées sensorielles. La diagonale représente le scénario où les entrées sont identiques aux sorties (Δ input = Δ output), alors que la portion jaune du graphique au-dessus de la diagonale décrit une situation dans laquelle les entrées sont moins ressemblantes (séparation de pattern : Δ output > Δ input). La portion bleue sous la diagonale décrit une situation dans laquelle les entrées sont plus ressemblantes (complétion de pattern : Δ output < Δ input). Dans ce schéma, la séparation et la complétion de pattern sont définis selon l'étendue de la déviation par rapport à la diagonale. Ce schéma est basé sur des données collectées chez les animaux et les humains (Lee and Kesner 2004, Leutgeb et al. 2004, Vazdarjanova 2004, Leutgeb et al. 2007, Bakker et al. 2008, Lacy et al. 2011). D'après Yassa et al. 2011.

Synapse	Rôles théoriques	Données expérimentales
CA3-CA3	• Réseau associatif pour le stockage initial de la mémoire • Plasticité Hebbienne de ses interconnexions • Agît comme un réseau attracteur • Joue un rôle dans la complétion de pattern	• L'inactivation pharmacologique de CA3, la délétion de GRIN1 dans les CP de CA3, ou l'inhibition des rNMDAs perturbe la mémoire d'un événement unique (Kesner 2007 McHugh and Tonegawa 2009) • Déficits d'apprentissage d'un événement unique chez des souris dont la PLT aux synapses CA3-CA3 est perturbée (Viana Da Silva et al. 2016) • Connectivité CA3-CA3 et liens théoriques avec la complétion de pattern (Guzman et al. 2016) • Modulation par la nouveauté des PPSE de champs aux afférences CA3-CA3 (Villarreal et al. 2007)
CE-CA3	• Joue un rôle dans le rappel de la mémoire	• Modulation par la nouveauté des PPSE de champs aux afférences CA3-CA3 (Villarreal et al. 2007)
GD-CA3	• Aide à l'encodage de la mémoire dans le réseau CA3-CA3 • Joue un rôle dans la séparation de pattern	• L'inactivation transgénique des CG adultes ou nées durant le développement a un impact différent sur la séparation et la complétion de pattern (Nakashiba et al. 2012) • La perturbation pharmacologique de la transmission GD-CA3 altère la représentation contextuelle nouvelle (Lassalle et al. 2000 Dumas et al. 2009) • Des souris présentant une perturbation de la PLT aux fm sont déficientes pour l'apprentissage incrémental (Otto et al. 2001) • L'exposition à un nouveau contexte régule la plasticité induite électriquement (Hagena and Manahan-Vaughan 2011) • Réarrangement structurel des boutons fm-CA3 lors de l'apprentissage (Routtenberg 2010 Holahan et al. 2006 Ruediger et al. 2011)
Connexions GABAergiques	• Non prises en compte	• Changements structurels des filopodes liés à l'apprentissage d'événement unique (Ruediger et al. 2011) • Changement du taux de PV dans les interneurons à la suite d'un apprentissage d'événement unique (Donato et al. 2013)

Tab. 1.2.: Liens entre les réseaux de CA3, leur plasticité, et la mémoire épisodique. A partir de Rebola et al. 2017.

1.2.3 Les oscillations de l'hippocampe

L'encéphalogramme hippocampique, correspondant à l'activité électrique de l'ensemble des neurones de l'hippocampe à un instant t , peut être classé selon différents patterns, dont chacun apporte des informations concernant un aspect particulier de la fonction hippocampique. En effet, si une électrode est insérée dans l'hippocampe et que l'activité électrique est enregistrée (dans une bande de fréquence de 1 à 200 Hz) pendant que l'animal se comporte naturellement, des motifs distincts d'activité électrique sont présents, et varient en fonction de l'état d'éveil, de la stimulation sensorielle, du comportement de l'animal, et de la localisation de l'électrode. Ces motifs d'activité électrique sont connus sous le nom "d'électroencéphalogramme" ou EEG. L'EEG reflète l'activité d'un grand nombre de neurones et inclut probablement les contributions de potentiels d'actions dans plusieurs types cellulaires, des potentiels synaptiques excitateurs et inhibiteurs, et des potentiels lents provenant des dendrites et des cellules gliales. En effet, toute membrane excitable - que ce soit une épine, une dendrite, un soma, un axone ou une terminaison axonale - et tout courant transmembranaire contribue au potentiel de champ extracellulaire. Le champ est la superposition de tous les processus ioniques, qu'ils soient rapides comme les potentiels d'actions ou bien lents comme les fluctuations dans les cellules gliales (Buzsáki et al. 2012).

De ce fait, il peut donner une mesure de l'activité globale d'une région cérébrale mais pas au même niveau de précision que l'enregistrement de cellules uniques. La mesure de l'EEG est utile lorsqu'une grande population de neurones est active de manière synchrone. Étant donné que l'on retrouve un mode d'activité synchronisé dans les aires corticales telles que l'hippocampe, certains motifs de l'EEG peuvent expliquer et faire la liaison entre le comportement d'un animal d'un côté, et l'activité de cellules uniques de l'autre. Il existe plusieurs type de motifs d'EEG hippocampique, et chaque motif apporte des informations quant à différents aspects de la fonction de l'hippocampe.

Dans l'hippocampe de rat se comportant, 6 motifs d'EEG ont été identifiés : 4 sont rythmiques, et 2 non-rythmiques. Les patterns rythmiques incluent :

- Theta (6-12 Hz, Fig. 1.13)
- Beta (12-30 Hz)
- Gamma (30-100 Hz)
- et les activités ondulatoires appelée "sharp wave ripples" (SWR) (100-200 Hz)

Les patterns non-rythmiques comprennent :

- la LIA (pour Large Irregular Activity ou Activité Large et Irrégulière, Fig. 1.13)
- la SIA (pour Small Irregular Activity ou Activité faible et Irrégulière)

Certains motifs peuvent être présents simultanément, par exemple les SWR sont présentes lors de périodes de LIA, et les oscillations gamma sont souvent retrouvées à l'intérieur d'oscillations theta. En revanche, certaines oscillations sont mutuellement exclusives : theta, LIA et SIA. Elles semblent également correspondre à des états de fonctionnement de l'hippocampe mutuellement exclusifs.

Le rythme theta est constitué d'oscillations rythmiques, sinusoïdes, qui varient en fréquence de

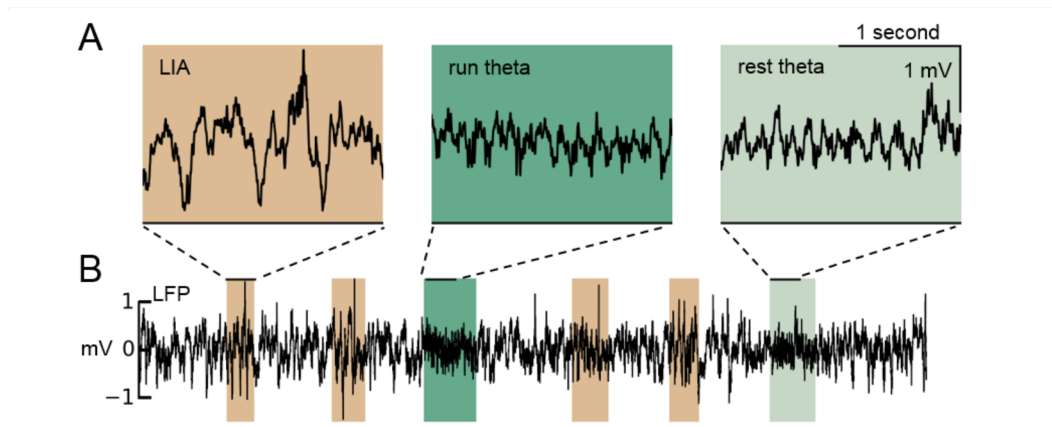


Fig. 1.13.: Exemple d'oscillations theta et LIA dans le LFP de CA3. (A) Exemples de périodes de LIA, de theta associé à la locomotion (run theta) ou non (rest theta). (B) Signal du LFP d'où proviennent les exemples montrés en (A). Plusieurs périodes de LIA sont détectées (marron), une période de theta est associée à la course de l'animal (vert foncé) et une période de theta n'est pas associée à la course (vert clair). Cet enregistrement provient de données exposées dans la partie Résultats de ce mémoire et a été réalisé dans le CA3 de l'animal éveillé tête fixée.

6 à 12 Hz chez le rat mais qui peuvent aller jusqu'à 4 Hz chez le lapin et le chat (Fig. 1.13, Whishaw and Vanderwolf 1973). La LIA est plus aléatoire et est souvent caractérisée par la présence d'ondulations "pointues" (sharp waves). Les ripples, des oscillations à haute fréquence (100-200 Hz) ont lieu pendant ces sharp waves. L'ensemble de ces deux oscillations est appelé "sharp waves ripples" (SWR) (Buzsáki et al. 1992). Les bandes de fréquences de la LIA sont généralement contenues dans les faibles fréquences (1-5 Hz). La SIA est un motif de faible amplitude qui contient un large spectre de hautes fréquences et n'a lieu qu'occasionnellement. Enfin, les oscillations Bêta et Gamma peuvent soit être présentes seules ou en combinaison avec theta, LIA ou SIA.

Chez le rongeur éveillé, l'activité theta est présente pendant le mouvement de l'animal : marche, course, nage, saut, exploration (mouvement de la tête, des moustaches). Le rythme theta se trouve également pendant le sommeil paradoxal ou REM, et occasionnellement pendant des périodes d'éveil ou d'attention immobiles (Vanderwolf 1971, Buzsáki 2002). La LIA est présente pendant les périodes où l'animal ne change pas de position, comme lorsqu'il est immobile, mange, boit, se nettoie, ou pendant le sommeil lent (Slow Wave Sleep, SWS). La SIA est peu fréquente, par exemple lorsqu'un mouvement est soudainement arrêté, ou lors de la transition entre le repos/sommeil et l'éveil (Vanderwolf 1971, Whishaw and Vanderwolf 1973). Les oscillations gamma sont de grande amplitude lorsqu'elles sont "nichées" dans les oscillations theta (Stumpf 1965, Leung et al. 1982, Buzsáki et al. 1983, Bragin et al. 1995). Les deux rythmes coexistent généralement simultanément mais sont générés indépendamment l'un de l'autre (Leung 1992, Stumpf 1965).

1.2.3.a. Le rythme Theta

Les oscillations theta et leur corrélats comportementaux ont été abondamment étudiés depuis leur découverte dans l'hippocampe de lapin par Jung et Kornmüller en 1938 (Jung R 1938). En 1954, Green et Arduini ont ensuite montré que la présence d'activité theta dans l'hippocampe était inversement corrélée avec la désynchronisation néocorticale, suggérant que theta représente un état d'éveil hippocampique (Green and Arduini 1954). Enfin, en 1969, Vanderwolf et al. ont observé que le rythme theta était corrélé aux "mouvements volontaires" de l'animal, par opposition à la LIA qui était présente lors d'actions fixes et stéréotypées (Vanderwolf 1969).

Mécanismes de génération du rythme theta. Il est généralement accepté que le septum médian (SM) joue un rôle dans la génération du rythme theta (Vertes and Kocsis 1997), parce que sa lésion ou son inactivation perturbe le rythme theta (Fig. 1.14, Green and Arduini 1954, Mitchell et al. 1982, Mizumori et al. 1990). Il existe dans le SM des cellules "pacemaker", des neurones qui sont capables de générer une activité rythmique spontanément (Ramirez et al. 2004), qui sont de nature GABAergique donc inhibitrice (Tóth et al. 1997), et expriment des canaux ioniques non-sélectifs activés par l'hyperpolarisation (HCN pour hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated non-selective cation channels) (Varga et al. 2008). L'activation des canaux HCN entraîne un lent courant dépolarisant (courant I_h) qui permet à la cellule d'atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action et donc de décharger. Dans les neurones qui expriment les canaux HCN, il peut émerger une séquence d'événements qui consiste en (i) un potentiel d'action, (ii) une hyperpolarisation caractéristique à la suite d'un potentiel d'action (after-hyperpolarisation) qui active les canaux HCN, (iii) une dépolarisation par l'action du courant I_h , et (iv) un autre potentiel d'action qui recommence le cycle. De ce fait, les canaux HCN facilitent la décharge rythmique des neurones. Une grande partie des neurones déchargeant rythmiquement selon theta expriment ces canaux (Maccaferri and McBain 1996, Dickson et al. 2000, Hu et al. 2002, Varga et al. 2008). Lorsque le theta hippocampique est supprimé après une lésion fornix-fimbria, la décharge rythmique persiste dans les cellules du SM (Andersen et al. 1979, Vinogradova et al. 1995). En effet, les interneurones exprimant les canaux HCN déchargent de manière rythmique aux mêmes fréquences et selon la même phase que les rythmes theta hippocampiques (Hangya et al. 2009). Les neurones cholinergiques du SM, en revanche, ne déchargent pas rythmiquement selon la fréquence de theta. Ces neurones pourraient moduler l'excitabilité d'autres neurones pour promouvoir leur décharge rythmique. L'hippocampe projette également au SM, et ces projections semblent être importantes pour maintenir les deux régions couplées (Tóth et al. 1993).

La formation réticulée (FR) du tronc cérébral joue également un rôle dans la génération de theta, via son action sur le SM. En effet, la seule stimulation électrique de la FR est suffisante pour générer des oscillations theta dans l'hippocampe (Green and Arduini 1954). Plus spécifiquement, le noyau *pontis oralis* (RPO pour Reticularis Pontis Oralis) de la FR est la région impliquée dans la génération de theta. Les cellules du RPO chez le rongeur éveillé déchargent à haute fréquence

de manière tonique (50 - 70 Hz) uniquement pendant le comportement moteur et le sommeil paradoxal (Fig. 1.14). De plus, sa stimulation, et non la stimulation de régions voisines de la FR, génère un rythme theta (Vertes 1980, Vertes 1981, McNaughton et al. 1986). Il semblerait que l'effet du RPO sur le SM et sur la génération de theta ne soit pas direct, étant donné l'absence de projections du RPO au SM. Le lien entre les deux régions semble se faire au niveau des noyaux supramamillaires (SUM), qui reçoivent des projections du RPO, et projettent au SM et à l'hippocampe (Fig. 1.14). De plus, certains neurones du SUM déchargent rythmiquement avec theta (Kirk and McNaughton 1991), l'activation électrique ou pharmacologique du SUM chez l'animal anesthésié entraîne le theta (Bland et al. 1990, Bland et al. 1994, Oddie et al. 1994, Bocian and Konopacki 2004), et son inhibition perturbe la décharge rythmique des cellules pacemaker du SM et élimine le theta dans l'hippocampe (Bland et al. 1994, Oddie et al. 1994). Il a été proposé que le SUM code pour la fréquence du rythme theta, et le SM pour son amplitude (Kirk and McNaughton 1993). Cependant, chez l'animal éveillé se comportant, bien que des lésions du SM entraînent une importante réduction du rythme theta hippocampique (Gray 1971), des lésions du SUM, en revanche, n'ont pas d'effet sur ce-dernier (Thinschmidt et al. 1995), remettant en question le rôle du SUM dans la génération du rythme theta. Une récente étude montre que l'inhibition optogénétique du SUM n'affecte pas le rythme theta en tant que tel dans CA1, mais décale par contre les phases de décharges des potentiels d'action des cellules du SUM par rapport aux interneurons de CA1, ce qui altère le degré de couplage de phase de ces potentiels d'action au theta de CA1. Le SUM pourrait donc jouer un rôle dans la création d'une interférence oscillatoire entre son propre rythme theta et le theta des régions auxquelles il projette, contrôlant la coordination temporelle à l'intérieur du circuit (Ito et al. 2018).

Il semblerait que le raphé médian (RM) joue un rôle dans l'arrêt de theta, donc dans la désynchronisation de l'EEG hippocampique. Le RM fait partie du cerveau moyen, et est constitué de cellules sérotoninergiques. La stimulation du RM désynchronise l'EEG dans l'hippocampe (Assaf and Miller 1978, Macadar et al. 1974, Vertes 1981, Yamamoto et al. 1979), et des lésions du RM produisent un theta continu, indépendamment du comportement de l'animal (Fig. 1.14, Maru et al. 1979, Yamamoto et al. 1979).

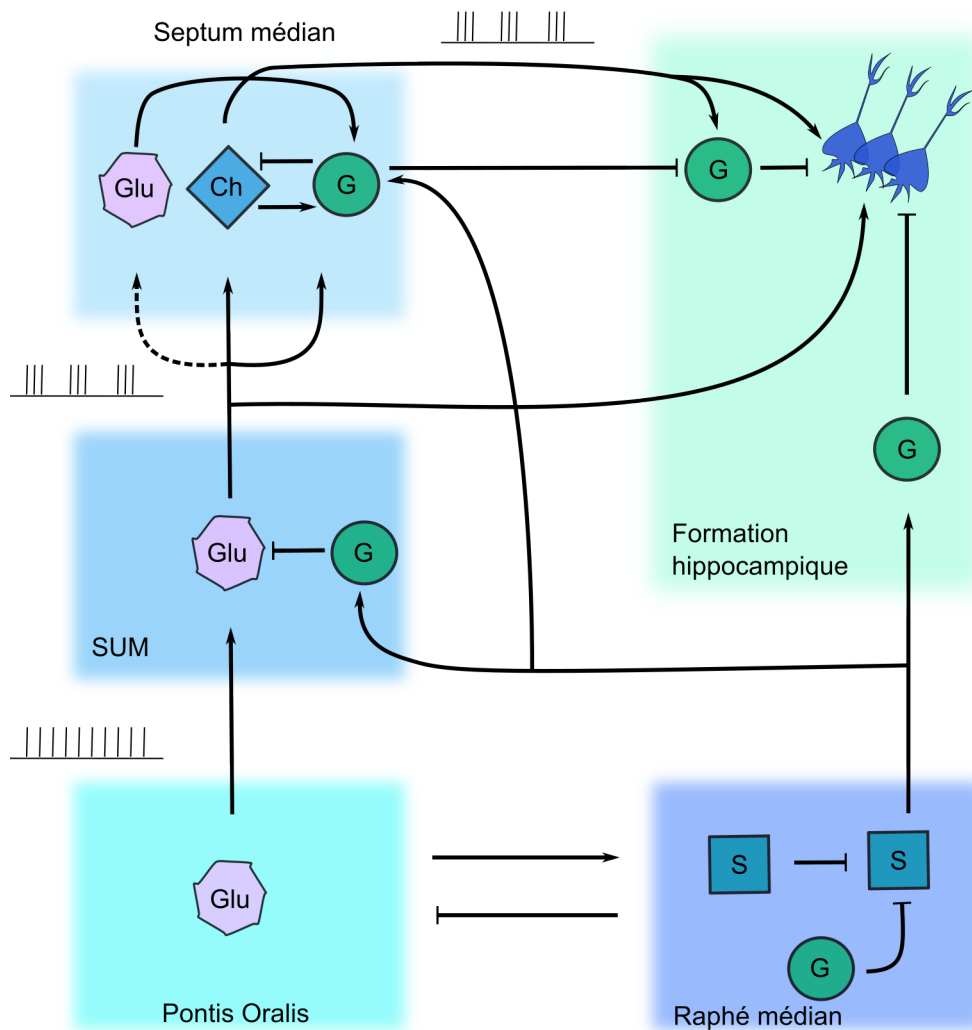


Fig. 1.14.: Diagramme des interconnexions majeures des systèmes ascendants contrôlant le rythme theta et sa désynchronisation dans l'EEG hippocampique. Pendant le theta, des cellules toniquement actives du POR activent des neurones glutamatergiques (Glu) du SUM. Le SUM convertit cette activité en activité rythmique relayée aux neurones cholinergiques (Ch) et GABAergiques (G) du SM. Les neurones GABAergiques du SM connectent des interneurons de l'hippocampe, induisant donc une désinhibition des CP. Les interneurons du SM reçoivent des informations glutamatergiques et cholinergiques des autres neurones septaux. Pendant la désynchronisation, certaines cellules sérotoninergiques (S) du RM projettent au septum et activent des interneurons GABAergiques qui inhibent en retour d'autres cellules GABAergiques et cholinergiques du SM. Des neurones sérotoninergiques du RM projettent aussi directement au SUM et à l'hippocampe ce qui pourrait entraîner la désynchronisation de l'EEG hippocampique. Reproduit depuis Vertes et al. 2004.

En plus des mécanismes de générations sous-corticaux de l'activité theta, il semblerait que d'autres régions soient impliquées dans sa génération. Des analyses de densité de source de courant (current source analyses) des potentiels de champs locaux indiquent que plusieurs dipôles électriques coexistent pendant le rythme theta (Kamondi et al. 1998b). Un consommateur de courant (current sink, par opposition à une source de courant, current source) est enregistré dans les *stratum lacunosum-moleculare* et *radiatum* et reflèterait les entrées excitatrices

provenant du CE et de CA3, respectivement (Colgin 2013). Une source de courant est également présente au niveau du *stratum pyramidale*, reflétant probablement l'activité d'interneurones. Ces interneurones déchargeraient de manière rythmique à la fréquence du rythme theta lorsqu'ils seraient libérés de l'inhibition provoquée par les interneurones du SM (Tóth et al. 1997). Après lésion du CE, le dipôle du *stratum lacunosum-moleculare* disparaît, suggérant que les informations provenant du CE seraient essentielles pour la génération de ce rythme theta, en plus des régions sous-corticales évoquées précédemment. Le rythme theta présent en absence de CE est sensible à l'atropine, un antagoniste cholinergique, confirmant le rôle du SM dans l'activité theta.

Enfin, des études ont montré que l'hippocampe isolé posséderait la machinerie nécessaire à la génération d'un rythme theta intrinsèque *in vitro*, même si les données montrent l'importance du SM dans la génération du rythme theta chez l'animal se comportant. Dans l'hippocampe isolé, les interneurones seraient nécessaires à la production des oscillations theta : des enregistrements de patch-clamp de CP de CA1 ont révélé la présence de PPSI rythmiques dans ces cellules, alors que des PPSE rythmiques ont été enregistrés dans les interneurones de CA1 (Goutagny et al. 2009). Ces résultats suggèrent qu'un rythme theta intra-hippocampique serait généré par des interactions locales entre les interneurones et les CP.

En conclusion, le rythme theta résulte de l'interaction précise de nombreuses structures cérébrales (RPO, SUM, SM, CE, RM, hippocampe) et de leurs différents types de neurones (cholinergiques, glutamatergiques, GABAergiques). Ces oscillations ayant un corrélat comportemental marqué, de nombreuses études se sont intéressées à leurs fonctions.

Fonctions du rythme theta. Comme mentionné précédemment, les rythmes theta apparaissent pendant le mouvement (Vanderwolf 1969) et présentent de plus fortes amplitudes lors de mouvements actifs plutôt que passifs (Terrazas 2005). Ils sont également observables lors de comportements associés à la réception de stimuli. Leur fréquence correspond à celle du mouvement des moustaches (Berg 2003) et de la respiration (Macrides et al. 1982) chez le rat, ainsi que celle des mouvements de saccades oculaires chez l'homme (Troncoso et al. 2010). Le rythme theta est sélectivement corrélé avec l'exploration active et non passive lors de la présentation de stimuli. Chez le rat explorant un stimuli pertinent, ou recevant un stimuli associé à une récompense, les rythmes theta sont corrélés temporellement avec la respiration (Macrides et al. 1982) et le mouvement des moustaches (Ganguly and Kleinfeld 2004). Cependant, aucune correspondance n'a été observée lorsque l'animal ne bouge ses moustaches que dans l'air (Berg et al. 2006). Ces oscillations sont également présentes pendant le sommeil paradoxal, mais leur rôle est moins clair. Elles semblent jouer un rôle dans la consolidation de la mémoire (Louie and Wilson 2001, Montgomery et al. 2008).

Les études menées chez le rat suggèrent 3 rôles possibles pour les rythmes theta. Premièrement, il agit comme un mécanisme de synchronisation globale, principalement en "verrouillant" l'entière formation hippocampique sur un seul mode de traitement et organise l'activité de chaque région de l'hippocampe par rapport aux autres. Des enregistrements simultanés de l'EEG de différentes régions de l'hippocampe ont montré que l'activité theta dans des régions comparables (comme la couche de CP de CA1) est synchronisée et cohérente sur un large volume de la formation hippocampique (Mitchell and Ranck 1980, Fox et al. 1986, Bullock et al. 1990). Cela signifie

que si deux cellules ont un pattern de décharge systématiquement lié au cycle theta local, elles sont également reliées temporellement, même si elles se situent loin l'une de l'autre au sein de l'hippocampe. Une deuxième fonction potentielle du rythme theta est de fournir un système de décharge périodique des neurones de l'hippocampe. La relation de phase entre chaque cellule pyramidale mesurée par rapport à l'activité theta simultanée n'est pas constante mais peut varier de cycle en cycle (O'Keefe and Recce 1993, Skaggs and McNaughton 1996b). En effet, on peut considérer le rythme theta comme une suite de cycles individuels de 360° chacun. Lorsqu'un rat se déplace dans le champ de décharge d'une cellule de lieu, cette dernière décharge des bouffées de potentiels d'action, et l'intervalle de temps entre ces bouffées est légèrement inférieure à celle du theta concomitant. Cela entraîne une "précession" de la phase de décharge de la cellule de lieu : elle est active de plus en plus tôt à chaque cycle theta successif. Après 5 à 7 cycles theta, qui généralement suffisent à contenir le champ de la cellule de lieu, la phase de l'EEG à laquelle la cellule décharge peut avoir un taux de précession de 360° par rapport à sa décharge de départ. De plus, la phase de décharge est hautement corrélée avec la position de l'animal à l'intérieur du champ de la cellule de lieu. De ce fait, la variation temporelle dans la fréquence de décharge transmet des informations concernant la position de l'animal dans l'espace (O'Keefe and Recce 1993). Une troisième fonction pour le rythme theta est de fournir un contrôle temporel sur l'induction de la PLT, et donc sur le stockage et le rappel de l'information par l'hippocampe. En effet, la stimulation en bursts à la fréquence de theta des afférences hippocampiques est un moyen efficace d'induire la PLT. De plus, il semblerait que des informations arrivant pendant la phase ascendante et positive du theta dans CA1 induisent une potentialisation, alors que celles arrivant pendant la phase descendante et négative entraînent une dépotentialisation ou dépression (Pavlidis et al. 1988, Huerta and Lisman 1995, Hölscher et al. 1997, Hyman et al. 2003).

1.2.3.b. Le rythme Gamma

Le rythme gamma (25-140 Hz) est également présent lors des périodes d'éveil comportemental. Les oscillations gamma ont une plus forte amplitude lorsqu'elles sont présentes à l'intérieur des oscillations theta, plus lentes (Bragin et al. 1995, Buzsáki et al. 1983). Même si les deux rythmes theta et gamma coexistent souvent, ils sont générés indépendamment (Leung 1992, Stumpf 1965). Contrairement aux rythmes theta qui sont généralement stables au cours de différents comportements, les oscillations gamma sont présentes en bouffées à des moments spécifiques du cycle theta (Bragin et al. 1995, Canolty et al. 2006, Colgin et al. 2009). Ils permettraient de sélectionner des ensembles de neurones pour le traitement d'information pendant ces périodes (Jensen and Colgin 2007, Jensen and Lisman 2005). Leur fréquence élevée leur permettrait de coordonner l'activité de cellules rapidement, au-delà de la possibilité de perception consciente. Deux générateurs indépendants des oscillations gamma semblent coexister, un se trouvant dans le CE, un autre dans CA3 (Bragin et al. 1995). Une analyse de densité de source de courant a montré que l'activité gamma dans l'hippocampe était plus importante au niveau de la couche

moléculaire du GD, recevant des informations du CEM. Quand ces projections sont lésées, les oscillations gamma restantes sont plus importantes dans CA1, au niveau du *stratum radiatum*, recevant les projections de CA3. Les oscillations gamma entraînées par CA3 et le CEM sont appelées lentes et rapides respectivement, et existent généralement au niveau de différentes phases du cycle theta sous-jacent (Colgin et al. 2009).

1.2.3.c. Activité large et irrégulière (LIA)

Pendant les périodes associées à un faible niveau d'éveil, l'EEG hippocampique est caractérisé par la présence d'activité large et irrégulière (LIA), pendant laquelle sont générées les sharp waves, des ondulations brusques et généralement de large amplitude, au sein desquelles se trouvent les ripples, des oscillations à haute fréquence (80-250 Hz) (Vanderwolf 1969, O'Keefe 1976, Buzsáki 1986). L'ensemble est appelé sharp-wave ripples (SWR). Dans CA1, ces SWR ont lieu le plus fréquemment pendant le sommeil lent et l'immobilité et moins fréquemment lors de prise de boisson ou nourriture. Elles apparaissent lors de périodes d'éveil faible et sont souvent, mais pas toujours, inhibée par un stimulus qui augmente cet état d'éveil. La LIA peut être considérée comme un état de repos de l'hippocampe, ou bien une absence d'oscillations theta (O'Keefe and Nadel 1978). Les SWR ont été proposées comme supportant la consolidation et le rappel de souvenirs récemment encodés (Carr et al. 2011).

Mécanismes de génération des SWR. Chaque sharp wave dure entre 50 et 100 ms, et sa polarité s'inverse dans la couche de CP de CA1, pour atteindre une amplitude négative maximale dans le *stratum radiatum*, au niveau des entrées provenant de CA3, pouvant aller jusqu'à 1 mV (Buzsáki 1986). Les SWR peuvent être enregistrées dans toutes les régions de l'hippocampe et dans le GD, et lorsqu'elles sont enregistrées bilatéralement à la même profondeur, leurs amplitudes et caractéristiques morphologiques sont similaires. De plus, elles ont lieu simultanément dans les deux hémisphères. Elles sont corrélées avec une augmentation de la décharge de tous les types de neurones. L'excitation dendritique peut surpasser l'inhibition somatique simultanée dans un nombre important de neurones, entraînant la décharge synchronisée d'une population neuronale. De ce fait, les SWR de CA1 représenteraient l'excitation synchronisée des cellules pyramidales par les collatérales de Schaffer couplée avec l'inhibition somatique produite par les interneurones. Les interneurones peuvent être excités par les collatérales de Schaffer ou par les axones des récurrentes des CP de CA1. Initialement, les SWR seraient générées dans CA3. En effet, l'hippocampe isolé est capable de les produire, suggérant qu'elles constituent une propriété intrinsèque à l'hippocampe. Elles sont de plus présentes dans l'hippocampe transplanté, qui ne reçoit qu'un nombre limité d'afférences du cerveau receveur (Buzsáki et al. 1989). Plusieurs données suggèrent que CA3 est la région où elles sont initiées. Les réseaux présentant une excitation récurrente, comme le réseau de CA3, donnent inévitablement naissance à des activités synchrones d'une partie de leurs neurones. CA3 représenterait le plus grand système

de récurrentes excitatrices du cerveau (Wittner and Miles 2007). Ce réseau représente donc un substrat idéal pour la génération d'activité synchrone d'un groupe de neurones (Traub and Wong 1982), élément nécessaire pour entraîner les SWR extracellulaires. Le fait que l'amplitude maximale des SWR dans CA1 et le GD se trouve au niveau des terminaisons des projections provenant de CA3, soit les collatérales de Schaffer et les projections de CA3 vers le hilus/le GD respectivement, est également en faveur de l'hypothèse d'une initiation des SWR dans CA3 (Buzsáki 1986). Des CP de CA3 peuvent être simultanément actives (Traub and Wong 1982, Buzsáki et al. 1983, Traub and Bibbig 2000), et cette activité synchronisée entraîne la dépolarisation des dendrites apicales des CP de CA1, générant une sharp-wave de polarité négative dans le *stratum radiatum*. Les CP alors actives dans CA3 et CA1 recrutent également des interneurones, dont l'activité combinée à celle des CP permet la génération de l'oscillation rapide appelée "ripple", dans la couche de cellules pyramidales (Buzsáki et al. 1992, Ylinen 1995, Csicsvari et al. 2000).

Fonctions des SWR et de la LIA. La présence de LIA dans l'EEG hippocampique pourrait représenter l'activité de l'hippocampe en absence de theta (O'Keefe and Nadel 1978). En effet, il existe un délai entre l'apparition de comportements associés à la LIA (comme l'immobilité) et l'apparition des SWR, suggérant une "libération" d'un phénomène actif, tel que pourrait être vu le theta. De plus, des lésions du fornix ne diminuent ni la fréquence, ni l'amplitude des SWR, au contraire, elles ont plutôt tendance à les augmenter, suggérant à nouveau qu'un contrôle inhibiteur entraînant le theta agit sur l'hippocampe et qu'en son absence, le rythme présent passivement dans l'hippocampe serait la LIA (O'Keefe and Nadel 1978). Une autre hypothèse a été formulée quant à la fonction de la LIA. Elle pourrait correspondre à un état actif de l'hippocampe, et permettre de renforcer les modifications synaptiques qui ont eu lieu immédiatement avant (Buzsáki et al. 1989). En effet, la stimulation des collatérales de Schaffer utilisée pour entraîner une PLT engendre une activité similaire à celle enregistrée lors des SWR spontanées. Les SWR qui feraient donc suite à une période de theta, où l'encodage d'information est censé avoir lieu, permettraient de consolider cet apprentissage et la mémoire relative à ce-dernier. Des données supportant cette hypothèse ont montré que lors des SWR survenant pendant le sommeil lent après l'exploration d'un environnement par un animal, les cellules de lieu qui avaient été actives dans cet environnement redeviennent actives. Ce phénomène est appelé "réactivation" ou "replay" (Skaggs and McNaughton 1996a). Plus ces cellules de lieu ont un champ proche l'un de l'autre dans l'environnement exploré par l'animal, plus la probabilité qu'elle soient actives l'une après l'autre lors des SWR dans la période de LIA suivante est élevée. La réactivation de ces représentations hippocampiques pendant les SWR a d'abord été étudiée pendant le sommeil (Ego-Stengel and Wilson 2010, Girardeau et al. 2009), renforçant l'idée que le sommeil est un état privilégié pour la consolidation de la mémoire. Cependant, la réactivation pendant les SWR a aussi été observé chez l'animal éveillé (Kudrimoti et al. 1999), indiquant que la LIA pendant l'éveil pourrait également favoriser la consolidation de la mémoire. De plus, la perturbation des SWR pendant un apprentissage empêche la stabilisation des cartes spatiales présentes dans l'hippocampe (Roux et al. 2017), suggérant que les SWR sont nécessaires à la stabilisation de la mémoire spatiale également. Enfin, la LIA pourrait permettre le transfert

d'information de l'hippocampe au néocortex. Des données montrent une corrélation entre les SWR hippocampiques et les spindles présentes dans le néocortex pendant le sommeil lent (Siapas and Wilson 1998). En effet, la mémoire à long-terme, après avoir été formée dans l'hippocampe, pourrait être transférée et stockée dans le cortex, suggérant l'existence de mécanismes permettant ce transfert (Squire., R. Larry & Alvarez. 1995).

1.2.3.d. Activité faible et irrégulière (SIA)

Les périodes d'activité faible et irrégulière (SIA) sont caractérisées par une activité de faible amplitude dans l'hippocampe et une désynchronisation de l'EEG néocortical. La SIA a d'abord été reportée lors de transitions d'un état de repos à un état d'éveil en absence de mouvement, par exemple lorsqu'un bruit sort l'animal du sommeil (Pickenhain and Klingberg 1967). La SIA est également présente lors d'arrêts abruptes de mouvements volontaires (Whishaw and Vanderwolf 1971). Pendant le sommeil lent, des périodes de SIA ont été enregistrées, survenant généralement après chaque épisode de sommeil paradoxal (ou REM) (Jarosiewicz et al. 2002). La SIA présente pendant le sommeil est caractérisée par un arrêt de la décharge de la plupart des cellules pyramidales. Seules 3 à 5% des cellules continuent d'être actives. Ces cellules permettraient de coder pour le lieu où l'animal s'est endormi, et seraient donc responsables de l'encodage de la position de l'animal pendant les périodes d'immobilité (Jarosiewicz and Skaggs 2004). En effet, des cellules présentant une décharge spécifique à la position dans l'environnement de l'animal pendant des périodes d'immobilité durant l'éveil ou le sommeil ont été enregistrées dans CA1 et CA2, mais pas dans CA3 (Kay et al. 2016). Cela suggère que les périodes de SIA dans CA3 pourraient avoir un rôle différent que dans d'autres régions de l'hippocampe. Contrairement aux périodes de LIA, la SIA est associée avec une microdilatation de la pupille de l'animal, ainsi qu'une hyperpolarisation du potentiel de membrane et une diminution de sa variance dans les CP de CA1 et les CG du GD (Hulse et al. 2017).

1.3 Activité électrophysiologique des neurones de l'hippocampe

1.3.1 Les différents enregistrements électrophysiologiques

Parmi les techniques électrophysiologiques utilisées *in vivo* en premier lieu dans l'hippocampe, on peut trouver :

- l'implantation de microélectrodes pour enregistrements unicellulaires juxtacellulaires
- l'utilisation de tétrodes et des sondes en silicone pour enregistrements multicellulaires chez l'animal se comportant
- l'enregistrement des potentiels de champ et des décharges de population de neurones

- les enregistrements intracellulaires après perforation de la membrane neuronale, ou grâce à la technique du patch-clamp en configuration cellule entière.

Les premiers enregistrements extracellulaires à l'aide de microélectrode ont été effectués dans l'hippocampe (Renshaw et al. 1940). Grâce à la forme caractéristique et unique du potentiel d'action de chaque neurone par rapport à la position de l'électrode, il est possible d'affirmer que l'activité enregistrée ne provient que d'un seul neurone (lors d'enregistrements juxtacellulaires à l'aide d'une microélectrode) ou de plusieurs neurones et de les différencier (lors d'enregistrements à l'aide de tétrodes ou de sondes en silicone (silicon probes)). Les enregistrements extracellulaires ont permis la découverte des cellules de lieu dans l'hippocampe et la description de leur relation avec l'activité theta, découverte qui a donné naissance à un domaine de recherche à part entière se concentrant sur l'apprentissage spatial et l'hippocampe (O'Keefe and Dostrovsky 1971, O'Keefe and Recce 1993). Les enregistrements multicellulaires ont également permis la découverte du replay des trajectoires spatiales pendant les périodes d'immobilité et de sommeil (Skaggs and McNaughton 1996b, Nádasdy et al. 1999). Le principal inconvénient des enregistrements extracellulaires réside dans le fait que les éléments cellulaires générant les signaux collectés sont peu connus. Les unités enregistrées sont généralement classées, en fonction de la largeur de leur potentiel d'action, comme provenant de cellules pyramidales (largeur plus importante) ou bien d'interneurones (largeur plus faible). Cependant, ces méthodes ont rarement été vérifiées. De plus, seule l'information de sortie des neurones est enregistrée, laissant inaccessible les informations concernant les entrées synaptiques. Enfin, les enregistrements extracellulaires sont sujets à un biais d'échantillonnage important, favorisant l'enregistrement des neurones les plus actifs et de taille plus importante (Towe and Harding 1970, Stone 1973, Olshausen and Field 2004).

Les enregistrements extracellulaires unitaires, appelés juxtacellulaires, ont l'avantage de permettre la stimulation et le marquage par coloration des neurones enregistrés, et ce à l'aide d'injection de courant via l'électrode (Duque and Zaborszky 2006, Pinault 1996). Ce courant permet de perforer la membrane des neurones et donc d'y faire entrer des ions, entraînant sa stimulation, ou des petites molécules (biocytine, neurobiotine), permettant une coloration immunohistochimique. Cette technique a été utilisée chez l'animal éveillé tête-fixée (Houweling and Brecht 2008, Voigt et al. 2008), et se comportant librement (Herfst et al. 2012, Tang et al. 2014). Elle a permis de mettre en évidence différents types d'interneurones hippocampiques et la relation entre leur activité et les oscillations theta ou les ripples (Klausberger et al. 2003). Le marquage par coloration de CP de CA3 a permis de tracer la totalité de leur arbre dendritique et de leur axone, et d'émettre l'hypothèse qu'étant donné la distribution regroupée de boutons pré-synaptiques le long de l'axone, certaines sous-populations de CP pourraient recevoir une innervation disproportionnée par rapport à d'autres neurones qui seraient innervés plus rarement (Li et al. 1994). La principale limite de cette technique réside dans le petit nombre de cellules enregistrées, ainsi que la possibilité d'endommager la cellule à cause d'une trop forte proximité entre la pipette et le neurone lors de l'enregistrement. Concernant les enregistrements intracellulaires, la première étude décrivant l'activité de cellules pyramidales hippocampiques *in vivo* chez l'animal anesthésié date de 1961 (Kandel et al. 1961). La technique utilisée consiste à perforer le soma du neurone à l'aide d'une électrode à pointe fine (moins de 0.5 μm) appelée

"sharp electrode". Cette technique, bien que plus facile d'application techniquement, entraîne généralement un dommage important de la membrane du neurone et donc un courant de fuite (voir 2.2.3., Li et al. 2004) pouvant modifier et altérer les enregistrements. En revanche, la technique du patch-clamp en configuration cellule entière permet généralement des enregistrements plus stables dans le temps, bien que techniquement plus difficiles à réaliser (Brette and Destexhe 2012). Les enregistrements intracellulaires sont les seuls permettant (i) d'avoir accès au potentiel de membrane des neurones et donc (ii) d'étudier les relations entrées-sorties d'informations au sein du même neurone. Cette méthode est utilisée chez l'animal anesthésié (Margrie et al. 2002, Zucca et al. 2017), mais également chez l'animal éveillé tête-fixée (Margrie et al. 2002, Bittner et al. 2015) et plus rarement se déplaçant librement (Lee et al. 2006, Lee et al. 2009). Cette méthode a les avantages des enregistrements juxtacellulaires : elle permet de marquer le neurone et de le stimuler. Mais l'information collectée est plus riche, car elle contient également les événements sous le seuil de déclenchement des potentiels d'action, tels que les PPSE et PPSI, ainsi que les potentiels d'action. Un potentiel post-synaptique unitaire (PPSEu ou PPSIu) peut être la conséquence d'un seul potentiel d'action pré-synaptique. Typiquement, ces PPSEu ou PPSIu sont de faible amplitude (environ 1 mV) et de courte durée (environ 10 ms). De ce fait, les importantes fluctuations du potentiel de membrane pouvant parfois atteindre le seuil de déclenchement de potentiel d'action sont le résultat de l'intégration d'un grand nombre d'entrées synaptiques le long de l'arbre dendritique du neurone (Petersen et al. 2003). Un neurone doit donc constamment intégrer ces informations et décharger ou non un potentiel d'action. Cette transformation entrée-sortie peut être étudiée grâce aux enregistrements intracellulaires, chez l'animal éveillé se comportant, et être corrélée à différents états comportementaux. Dans CA1, ces enregistrements ont permis de mettre en évidence la présence de potentiels en plateau (Kamondi et al. 1998b) chez l'animal anesthésié. Ces potentiels en plateau générés dans les dendrites des cellules pyramidales de CA1 sont produits par une interaction des informations reçues par CA3 et le CE à des intervalles de temps précis. Ces signaux concomitants modulent positivement la décharge des cellules de lieu et induisent de nouveaux champs de décharge dans ces CP (Bittner et al. 2015). Des enregistrements intracellulaires ont également mis en évidence des différences entre les cellules de lieu et les cellules "silencieuses" dans CA1 : les cellules de lieu ont un seuil de décharge de potentiel d'action plus faible, et les variations du potentiel de membrane sont généralement plus importantes dans les cellules de lieu, qui restent de ce fait proches du seuil de déclenchement des potentiels d'action et donc plus facilement excitables (Epsztein et al. 2011).

Ce type d'enregistrement permet également de corrélérer l'activité intracellulaire d'un neurone avec les potentiels de champs locaux, et donc les oscillations hippocampiques, en fonction du comportement de l'animal. En effet, la génération de ces oscillations serait dépendante de la modulation des propriétés intracellulaires des neurones de l'hippocampe, telles que le potentiel de membrane de la cellule au repos, la distance avec le seuil de déclenchement des potentiels d'action, et l'efficacité synaptique (Winson and Abzug 1977, Hasselmo 1999, Harris et al. 2011, Lee and Dan 2012, Marder 2012).

1.3.2 Activités intracellulaires liées aux oscillations

Activité intracellulaire liées aux oscillations theta. Les cellules pyramidales de l'hippocampe seraient les principales génératrices des courants extracellulaires et donc des oscillations telles que les oscillations theta. Dans l'hippocampe, certaines études se sont intéressées aux corrélats intracellulaires des oscillations theta, souvent chez l'animal anesthésié, généralement dans CA1 et le GD, plus rarement dans CA3. Lors d'enregistrements extracellulaires (qui ne peuvent, par définition, qu'enregistrer les neurones actifs et ne représentent donc pas toute la population neuronale), la décharge de la plupart des neurones est fortement modulée par la phase du rythme theta. Pendant le mouvement, les CP et les interneurons de toutes les sous-régions de l'hippocampe, ainsi que les CG du GD, ont une probabilité de décharge maximale aux alentours du pic positif du rythme theta enregistré dans la couche moléculaire externe du GD (Fox et al. 1986). Les CP de l'hippocampe présentent également des oscillations intracellulaires de leur potentiels de membrane cohérentes avec le theta enregistré extracellulairement (Leung and Chi Yiu Yim 1986). Chez le rat anesthésié à l'uréthane, le theta engendré par un pincement de la queue de l'animal et le theta émergeant spontanément sont associés à une hyperpolarisation des CP de CA1 (de 2 à 10 mV), et l'oscillation intracellulaire n'atteint que rarement le seuil de déclenchement des potentiels d'action (Kamondi et al. 1998b). Lors de cette hyperpolarisation, la résistance d'entrée du soma de ces neurones diminue. Ce phénomène est appelé "shunting inhibition" et proviendrait dans ce cas de l'inhibition GABAergique des CP par les interneurons en panier et de type chandelier. Ce genre d'inhibition a pour effet de court-circuiter les courants générés aux synapses excitatrices adjacentes. La résistance d'entrée du neurone diminue localement et, selon la loi d'Ohm ($U(V) = R(\Omega) \times I(A)$), l'amplitude des CPSE suivants est diminuée. Chez l'animal éveillé en revanche, la transition au rythme theta est associée avec une augmentation de la vitesse de locomotion, du mouvement des moustaches ainsi qu'une dilatation des pupilles, mais ces changements ne sont pas associés avec une modulation du potentiel de membrane ou de ses fluctuations dans les CP de CA1 et les CG du GD (Hulse et al. 2017). Cependant, il existe des différences entre le potentiel de membrane et ses fluctuations pendant des périodes de theta par rapport à des périodes de LIA ou SIA : la plupart des neurones sont plus dépolarisés pendant la LIA et le theta par rapport à la SIA, et ont tendance à être plus dépolarisés également pendant la LIA que le theta. De manière similaire, les fluctuations du potentiel de membrane, soit sa variabilité, sont significativement plus importantes pendant la LIA par rapport au theta et à la SIA, et ont tendance à être plus importantes pendant le theta que la SIA. De ce fait, les CP de CA1 et les CG sont plus proches du seuil de déclenchement des potentiels d'action pendant la LIA et le theta que pendant la SIA (Hulse et al. 2017). Concernant l'activité des cellules de lieu par rapport aux oscillations theta en condition de navigation spatiale, la précession de phase de la décharge des cellules de lieu par rapport au theta extracellulaire est associée à un décalage du theta intracellulaire, et la CP continue de décharger au moment du pic du theta intracellulaire, qui lui se décale par rapport au theta extracellulaire (Fig. 1.15, Harvey et al. 2009).

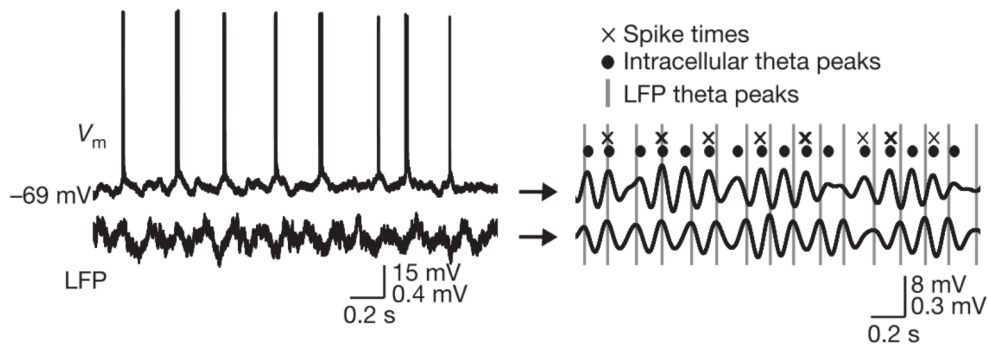


Fig. 1.15.: Potentiel de membrane d'une cellule de lieu de CA1 et potentiel de champ local correspondant bruts (gauche) et filtrés (6-10 Hz, droite). Les pics du theta extracellulaire (lignes grises), du theta intracellulaire (ronds), et les potentiels d'actions (croix) illustrent la précession de phase des potentiels d'actions et du theta intracellulaire par rapport au theta extracellulaire, et l'absence de précession entre les potentiels d'actions et le theta intracellulaire. (D'après Harvey et al. 2009)

Activité intracellulaire liées aux périodes de LIA. La plupart des études se sont intéressées aux corrélats intracellulaires des SWR survenant pendant la LIA, généralement dans CA1 (Buzsáki 1986, Ylinen et al. 1995, Kamondi et al. 1998a, , Maier et al. 2011, English et al. 2014, Valero et al. 2015, Hulse et al. 2016, Hulse et al. 2017), parfois dans le GD (Hulse et al. 2017), mais jamais (ou uniquement extracellulairement (Buzsáki 1986, Ylinen 1995)) dans CA3. Chez l'animal éveillé, le potentiel de membrane des CP de CA1 est modulé par les SWR. Cette modulation présente 3 composantes : le potentiel de membrane (i) se dépolarise, puis (ii) présente une ripple superposée sur cette dépolarisation, et (iii) s'hyperpolarise à la suite de cette ripple. Cette modulation varie en fonction du potentiel de membrane de la cellule : lorsqu'elle est hyperpolarisée, la dépolarisation associée à la SWR est plus importante, alors que les neurones dépolarisés présentent de plus importantes hyperpolarisations à la suite de la ripple. Cette variabilité entre les cellules peut donc s'expliquer par une variabilité de la force motrice (driving force) due aux différences de potentiels de membrane. Cette différence peut aussi provenir de différentes positions des CP dans le *stratum pyramidale*. En effet, différentes réponses ont été enregistrées entre des CP superficielles ou profondes (Valero et al. 2015) de la couche pyramidale. De plus, lorsque la SWR extracellulaire est de large amplitude, l'hyperpolarisation et la ripple intracellulaire seront plus importantes également, alors que la dépolarisation restera constante. Enfin, la décharge des CP survient généralement au niveau du creux de la ripple, lorsque la pente du potentiel de membrane est proche de son maximum. Les SWR dans CA1 seraient générées par les entrées excitatrices provenant des CP de CA3 actives en synchronie. La dépolarisation enregistrée dans les CP de CA1 reflète certainement cette excitation. A la suite de cette excitation, une population de CP et d'interneurones déchargent à haute fréquence et produisent l'ondulation appelée "ripple". Cette ripple est également présente intracellulairement, superposée sur la dépolarisation associée à la sharp-wave. L'inhibition produit également une hyperpolarisation durant quelques centaines de millisecondes, s'étendant après la fin de la ripple,

suggérant une activation des récepteurs GABA B (Ulrich and Bettler 2007, English et al. 2014). Cette inhibition serait responsable de l'hyperpolarisation présente intracellulairement à la fin de la SWR extracellulaire.

Lors de la transition à la LIA, les CG et les CP de CA1 présentent une dépolarisation, et l'amplitude des fluctuations du potentiel de membrane augmente (Fig. 1.16). Ces fluctuations représentent la variance du potentiel de membrane. Cependant, pendant la LIA, les CG sont plus hyperpolarisées et la variance de leur potentiel de membrane est plus élevée par rapport aux CP de CA1 (Fig. 1.16 Hulse et al. 2017). Avant le début d'une SWR, le potentiel de membrane des cellules principales de CA1 et du GD se dépolarise pendant environ 1s, créant une "rampe" de dépolarisation. Ces rampes reflèteraient un changement dans les propriétés intrinsèques aux neurones, pouvant provenir d'un changement de neuromodulation dépendant de l'état cérébral. En effet, le diamètre de la pupille de l'animal se contracte au même moment que la rampe intracellulaire débute. On sait que les changements de diamètre de pupille reflètent les fluctuations des états cérébral et d'éveil (Reimer et al. 2014). De ce fait, des changements de taux de neuromodulateurs pendant la LIA pourrait contribuer aux rampes intracellulaires.

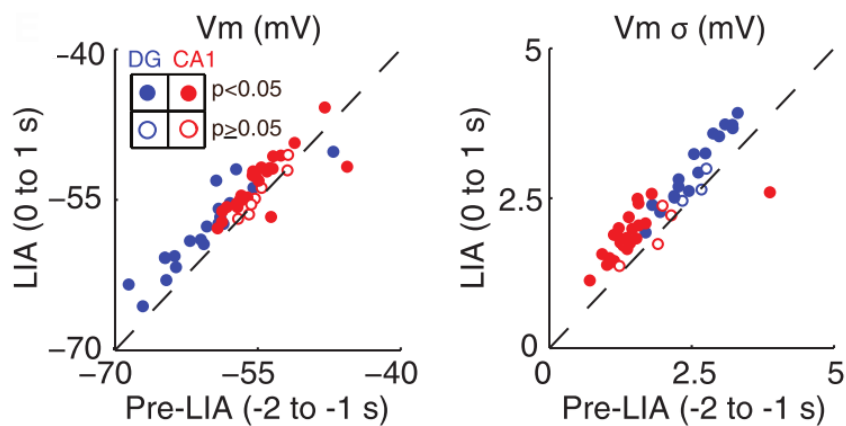


Fig. 1.16.: La LIA est associée avec une dépolarisation et une augmentation de la variance du potentiel de membrane des CG et des CP de CA1. Le panel de gauche représente le potentiel de membrane (V_m) moyen avant (pre-LIA) vs après (LIA) les transitions à la LIA. Chaque point représente la moyenne d'un seul neurone. Les CG du GD sont en bleu, et les CP de CA1 en rouge. Les changements significatifs sont représentés par des cercles remplis. Le panel de droite montre de manière similaire la moyenne de l'écart type du V_m ($V_m\sigma$), avant et après les transitions à la LIA. D'après Hulse et al. 2017.

1.4 CA3 et maladies

L'hippocampe est sujet aux mêmes pathologies que les autres aires corticales, telles que les tumeurs ou les malformations vasculaires. De plus, il est particulièrement vulnérable aux lésions survenant à la suite d'ischémie, d'hypoxie, de trauma, ou d'hypoglycémie. Il existe aussi des pathologies où l'hippocampe joue un rôle critique dans la manifestation de la maladie. Les deux pathologies majeures de ce type sont la maladie d'Alzheimer et l'épilepsie du lobe temporal,

représentant environ 60% du nombre total d'épilepsies. La maladie d'Alzheimer et l'épilepsie font partie des maladies neurologiques les plus fréquentes, avec 20 million et 50 million de personnes affectées, respectivement.

1.4.1 Épilepsie

L'épilepsie se caractérise par la présence de crises d'épilepsie, et est l'une des maladies neurologiques les plus répandues, affectant 0.4 à 1.0% de la population mondiale (Sander and Shorvon 1996). Les crises d'épilepsie peuvent être divisées en crises partielles, qui sont générées par une région cérébrale spécifique, et généralisées, qui apparaissent simultanément dans tout le cortex. Respectivement, elles constituent approximativement 40% et 50% des crises d'épilepsies chez les nouveaux cas diagnostiqués (10% des crises ne rentrent dans aucune des deux catégories) (Sander and Shorvon 1996). Toutes les épilepsies résultent d'une anomalie cérébrale sous-jacente : les épilepsies partielles proviennent généralement de tumeurs ou de cicatrices dans le tissu cérébral à la suite d'une lésion, et les épilepsies généralisées ont plus souvent une cause génétique ou métabolique. Pour autant, une cause n'est identifiée avec certitude que chez environ 30% des patients (Sander and Shorvon 1996).

Parmi les épilepsies partielles, on trouve l'épilepsie du lobe temporal (ELT), qui représente environ 60% des épilepsies partielles. La lésion neuropathologique la plus commune retrouvée chez les patients présentant une ELT est la sclérose hippocampique, ou la sclérose de la corne d'Ammon, qui est retrouvée chez la moitié des patients (Bruton 1988). Les autres pathologies pouvant entraîner une ELT sont celles apparaissant à la suite de lésions et qui incluent des malformations vasculaires, des malformations du développement cortical, et des tumeurs glioneuronales (Wolf and Wiestler 1993). Plusieurs données suggèrent que les crises d'épilepsies lors d'une ELT sont générées dans l'hippocampe : (i) la sclérose hippocampique est associée avec un type particulier de crise, appelée la crise psychomotrice, (ii) des EEG démontrent le départ de la crise d'épilepsie dans l'hippocampe, et (iii) l'ablation de l'hippocampe sclérosé entraîne la disparition des crises. L'activité électrique du cerveau au moment des crises est nommée ictale ou critique, et celle enregistrée entre les crises est dite interictale ou intercritique. Toutes deux sont sous-tendues par une décharge neuronale anormale, mais elle est rapide et simple en cas d'activité interictale et soutenue et complexe en cas de crise. L'activité épileptique résulte de deux phénomènes : la décharge excessive des neurones sous la forme de bursts (un burst est défini comme une brève période de décharge à haute fréquence (> 100 Hz) du neurone suivie par une période d'inactivité) et la synchronisation d'un grand nombre d'entre eux. Dans l'hippocampe, les CP de CA3 et quelques CP de CA1 sont capables de décharger en burst. Dans CA3, la décharge en burst d'une seule CP est capable d'entraîner un burst synchronisé dans le réseau entier (Miles and Wong 1983), grâce aux extensives interconnexions entre les CP. *In vitro*, des bursts de population de neurones sont facilement initiés dans la région CA3a, où l'excitabilité cellulaire et les connexions récurrentes entre les neurones sont plus importantes (Wittner and Miles 2007).

Globalement, c'est la capacité qu'a l'hippocampe de générer et maintenir un comportement

oscillatoire, ainsi que sa plasticité et sa vulnérabilité aux lésions neuronales qui contribuent au rôle important qu'il joue dans l'épilepsie.

1.4.2 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer représente la plus grande cause de démence dans le monde. Cette maladie neurodégénérative se caractérise par l'accumulation de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on estime aujourd'hui à 47,5 millions le nombre de personnes dans le monde atteintes de démences. La maladie d'Alzheimer est impliquée dans 60 à 70% des cas. En France, 900 000 personnes sont atteintes par la maladie. Le principal facteur de risque de l'apparition de la maladie est l'âge : 1 personne de moins de 60 ans sur 2 000 est atteinte, contre 1 sur 200 chez les personnes de plus de 60 ans. La caractéristique principale de la maladie d'Alzheimer est la perte de mémoire. Le déficit de mémoire épisodique apparaît tôt dans l'évolution de la maladie et est généralement le symptôme le plus proéminent tout au long de celle-ci. Une dysfonction progressive d'autres domaines cognitifs est également observée, et les stades finaux de la maladie sont caractérisés par un déficit sévère et global des fonctions cognitives. Une propriété de cette maladie réside dans le fait qu'elle se caractérise en premier lieu par un déficit remarquablement spécifique des fonctions cognitives : les patients perdent leur capacité à encoder des nouveaux souvenirs, d'abord ceux concernant des détails triviaux puis ceux plus importants de la vie quotidienne. Des données suggèrent que la protéine amyloïde A Beta et son oligomérisation ou polymérisation serait à l'origine de ces symptômes précoces. Cette accumulation entrainerait dans un premier temps le dysfonctionnement puis la perte de synapses, et ce avant la formation de plaques et d'enchevêtrements neurofibrillaires (Selkoe 2002). Bien que ces processus ont été étudiés de manière plus importante dans CA1 (Marchetti and Marie 2011, Sheng et al. 2012), des déficits ont également été mis en évidence dans CA3 et son réseau de connexions récurrentes, permettant l'encodage de la mémoire épisodique (Viana Da Silva et al. 2016). En effet, l'apparition des symptômes liés à la maladie d'Alzheimer chez un modèle de souris APP/PS1 est associée à une suppression de la PLT aux connexions CA3-CA3 due à l'activation de récepteurs A2A à l'adénosine qui sont surexprimés dans le compartiment post-synaptique (Viana Da Silva et al. 2016). Les dysfonctions majeures des synapses observées dans la maladie d'Alzheimer seraient donc causées par une augmentation du taux d'A Beta soluble, ainsi qu'une diminution de la fonction d'une protéine appelée présiniline, dont la mutation est responsable de formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Larner and Doran 2006). Malgré un grand nombre de données décrivant des mutations de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (APP, présiniline, ApoE), de nombreux modèles animaux reproduisant certains de ces déficits génétiques, et des études biochimiques du fonctionnement des protéines A Beta et APP, la pathogenèse de cette maladie reste partiellement incomprise, ainsi que sa relation avec d'autres formes de démences (Sheng et al. 2012).

APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES

Approches méthodologiques

La technique principale utilisée pour l'obtention des résultats de ce mémoire est la technique d'électrophysiologie *in vivo* chez l'animal éveillé tête fixée. Différents types d'enregistrements ont été réalisés, notamment des enregistrements de patch-clamp en configuration cellule-entière des CP de CA3 (voir 2.1.4) et, dans le même temps, des enregistrements de potentiels de champs locaux hippocampiques (voir 2.1.1). Dans le but d'étudier la modulation de l'activité intracellulaire des CP de CA3 en fonction de différents états physiologiques et comportementaux de l'animal nous avons enregistré d'autres variables au cours de nos expériences : le comportement locomoteur et le diamètre de la pupille de l'animal (voir 2.2.3).

2.1 Les enregistrements électrophysiologiques *in vivo*

Les cellules excitables, dont les neurones, s'expriment électriquement. En effet, une cellule est délimitée par une double membrane lipidique, agissant comme un isolant. L'intérieur et l'extérieur des cellules sont composés d'une solution saline diluée, donc conductrice. La séquence conducteur-isolant-conducteur définit un condensateur. La principale caractéristique d'un condensateur réside dans le fait qu'il peut stocker des charges (Q , mesurée en Coulombs) proportionnelles au potentiel ou voltage imposé, donnant l'équation $Q = CV$, où la constante de proportionnalité est la capacitance C mesurée en Faraday (F). La capacitance des membranes biologiques est très faible et est considérée comme étant égale à $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Cependant, la membrane des neurones ne peut être considérée comme un condensateur pur, car elle contient de nombreuses protéines et canaux transmembranaires conduisant les ions, introduisant une conductance (ou résistance) en parallèle avec la capacitance de la cellule. Le mouvement des charges et donc du courant par ces conductances charge ou décharge la capacitance de la membrane et est donc responsable des variations du potentiel de membrane. Le flux de courant est sous le contrôle de la loi d'Ohm : $U(\text{V}) = R(\text{Ohm}) \times I(\text{A})$. L'électrophysiologie permet de mesurer les changements de voltage ou de courant électrique à différentes échelles. En neurosciences, l'électrophysiologie *in vivo* peut s'effectuer selon différentes échelles en fonction de la question souhaitant être adressée. Elle s'étend de l'enregistrement de l'activité de cellules uniques, extracellulairement et intracellulairement jusqu'à des enregistrements à grande échelle de l'activité électrique de populations de neurones et des potentiels de champ relatifs à cette activité.

2.1.1 Les potentiels de champs

L'enregistrement des courants électriques générés par tous les événements cellulaires actifs à un endroit et moment spécifiques peut être appelé (i) électroencéphalogramme (EEG) lorsqu'enregistré au niveau du crâne, (ii) électrocorticogramme (ECoG) lorsqu'enregistré sur la surface corticale via une grille d'électrodes, et (iii) potentiel de champ local (LFP pour Local Field Potential, aussi appelé EEG intracrânien) lorsqu'enregistré à l'aide d'une électrode implantée dans le cerveau (Fig. 2.1).

Ce champ électrique est la superposition de tous les processus ioniques, des potentiels d'actions aux lentes fluctuations des cellules gliales. De ce fait, tout courant transmembranaire, indépendamment de son origine, entraîne une modification du voltage intracellulaire ainsi qu'extracellulaire (donc contribue au LFP). Les caractéristiques du signal du LFP, telles que son amplitude et sa fréquence, dépendent de la contribution proportionnelle de sources multiples, et des propriétés du tissu cérébral. Plus les événements ont lieu loin de l'électrode mesurant le LFP, moins ils auront un impact sur l'enregistrement. De la même manière, le tissu cérébral ayant des propriétés filtrantes pour les hautes fréquences (supérieures à 100 Hz), les événements tels que les potentiels d'action sont atténués de manière importante par le tissu cérébral. La contribution des potentiels d'action au LFP est donc restreinte aux neurones adjacents à l'électrode d'enregistrement (Bédard and Destexhe 2014). Lorsqu'une population de neurones est active de manière synchrone, alors les courants de ces cellules s'additionnent virtuellement pour former un LFP rythmique, pouvant correspondre aux oscillations telles que les activités theta et gamma mentionnées précédemment. En effet, les courants simultanés génèrent des fluctuations de forte amplitude dans le LFP, alors que des courants asynchrones ne peuvent pas s'additionner et demeurent de ce fait de trop faible amplitude pour être détectés dans le LFP (Colgin 2016).

L'enregistrement du LFP local dans l'hippocampe via une microélectrode permet d'étudier les différents rythmes caractéristiques de l'EEG hippocampique. Dans le but de corrélérer cette activité avec l'activité intracellulaire de cellules uniques de CA3, nous avons réalisé des enregistrements simultanés du LFP local et des CP de CA3. Cela nous a permis de mettre en évidence les dynamiques intracellulaires des CP de CA3 en fonction de différentes oscillations de l'hippocampe et donc différents états d'éveil et comportements.

2.1.2 Les enregistrements extracellulaires

Les enregistrements extracellulaires sont la manière la plus directe et celle généralement utilisée lorsqu'il s'agit d'enregistrer uniquement l'activité de décharge d'un ou de plusieurs neurones *in vivo*. Cette activité est enregistrée à l'aide de fines microélectrodes insérées dans le cerveau, permettant de capter l'activité d'un ou de plusieurs neurone(s) situé(s) à proximité de cette électrode (Fig. 2.1).

2.1.2.a. Les enregistrements extracellulaires multi-unitaires

Lorsqu'il s'agit d'enregistrer plus d'un neurone simultanément chez l'animal éveillé se comportant sur une période de temps prolongée, les enregistrements extracellulaires multi-unitaires sont les plus adaptés. L'introduction de la tétrode (McNaughton et al. 1983) a permis la démocratisation des enregistrements multi-unitaires, notamment dans l'hippocampe (Wilson and Mcnaughton 1993, O'Keefe and Recce 1993). Une tétrode est un ensemble de microcables métalliques à faible résistance entremêlés de façon à ce que leurs sites d'enregistrements soient proches les uns des autres. La taille importante et la faible résistance de ces sites permettent l'enregistrement de jusqu'à 20 neurones simultanément, et les potentiels d'action de ces neurones peuvent être séparés grâce à leurs différences d'amplitude et de forme le long des sites d'enregistrement. Pour pouvoir enregistrer plus de neurones, il est nécessaire de rajouter des sites d'enregistrements. En effet, la fréquence de décharge moyenne des cellules principales de l'hippocampe étant faible, plus de sites d'enregistrements permettent d'optimiser et de récolter une quantité de donnée plus importante. Cependant, l'ajout de sites d'enregistrements entraîne l'augmentation de la taille de la tétrode. Pour pouvoir maintenir une électrode de taille raisonnable et limiter le dommage des tissus cérébraux, des techniques de microfabrication utilisant le silicone ont été développées. Cette miniaturisation a rendu possible le développement de sondes de silicone contenant plus de 16 sites (Ylinen 1995, Kuperstein and Whittington 1981). De nombreux progrès ont permis le développement de sondes de silicone contenant un nombre beaucoup plus important de sites d'enregistrements (jusqu'à 960, Rios et al. 2016, Jun et al. 2017). Ces techniques ont profondément influencé l'étude de l'activité neuronale hippocampique et du comportement spatial.

2.1.2.b. Les enregistrements extracellulaires de cellules uniques

Lors d'enregistrements extracellulaires de cellules uniques, appelés aussi juxtacellulaires, une électrode à pointe fine est avancée dans le tissu jusqu'à ce qu'un potentiel d'action extracellulaire dominant soit détecté (Fig. 2.1). Ce potentiel d'action provient généralement de l'activité d'un seul neurone. La microélectrode peut être en métal ou bien simplement une micropipette de verre. Le principal avantage des enregistrements juxtacellulaires réside dans la possibilité de stimuler et de marquer pour coloration le neurone enregistré. La physiologie et la connectivité de neurones uniques peut donc être caractérisée, et l'activité de la cellule corrélée avec le comportement et la physiologie de l'animal. La stimulation électrique et chimique (comme l'application locale d'antagoniste (Zucca et al. 2017)) de cellules identifiées au niveau du site d'enregistrement peuvent également être utilisées pour perturber l'activité du neurone. Cependant, les événements synaptiques influençant l'excitabilité de la cellule sans pour autant entraîner la génération d'un potentiel d'action restent inaccessibles lors de ce type d'enregistrements. De plus, au niveau du circuit de neurones, une électrode extracellulaire ne mesure l'activité que d'un neurone,

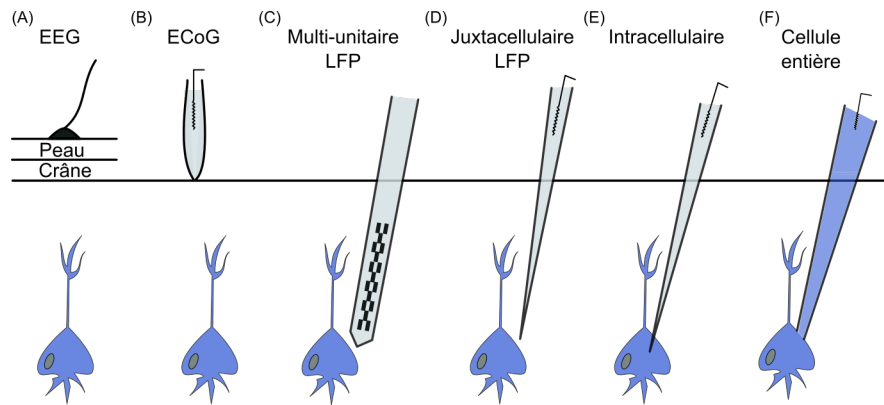


Fig. 2.1.: Les différents enregistrements électrophysiologiques *in vivo*. (A) L'EEG mesure l'activité électrique du cerveau par des électrodes placées sur le cuir chevelu. (B) L'ECoG permet de mesurer l'activité du cortex en plaçant directement les électrodes sur la surface du cerveau. (C) Les enregistrements multi-unitaires permettent de mesurer l'activité de plusieurs dizaines de neurones simultanément, ainsi que le potentiel de champ dans le voisinage de ces neurones. (D) Des microélectrodes permettent d'enregistrer l'activité de cellules uniques extracellulairement, ou le LFP local. (E) De fines microélectrodes permettent de casser la membrane neuronale et d'entrer à l'intérieur du neurone pour effectuer des enregistrements intracellulaires. (F) Des électrodes à la pointe plus large permettent l'enregistrement en configuration cellule-entière selon la technique du patch-clamp et d'avoir accès aux événements intracellulaires sous le seuil de déclenchement des potentiels d'action.

rendant plus difficile l'interprétation de l'activité du réseau, par rapport aux enregistrement multi-unitaires (Heinricher 2004).

2.1.3 Les enregistrements intracellulaires

Les enregistrements intracellulaires permettent de mesurer le voltage ou le courant traversant la membrane de la cellule. Une électrode est insérée dans la cellule, et une électrode de référence est positionnée en dehors de la cellule. Typiquement lors d'enregistrements *in vivo*, l'électrode de référence est placée au niveau du cervelet ou bien du scalp de l'animal. Les électrodes sont connectées à un amplificateur mesurant le potentiel de membrane (Fig. 2.2 A). Les changements de décharge de potentiels d'action d'une cellule sont souvent attribués à des changements d'activité au niveau du réseau neuronal mais peuvent également provenir de changements intrinsèques aux neurones. Pour étudier ces phénomènes, l'électrophysiologie intracellulaire reste la seule méthode permettant d'enregistrer les informations d'entrée et de sortie des cellules. Les premiers enregistrements intracellulaires de potentiels d'action ont été réalisés dans l'axone géant de calmar en 1939 par Hodgkin et Huxley (Hodgkin and Huxley 1939). Les auteurs ont mis en évidence que le potentiel de membrane de la cellule se dépolarise significativement pendant le potentiel d'action, reflétant une augmentation de la perméabilité de la membrane au sodium (Katz and Hodgkin 1948). Quelques années plus tard étaient effectués les premiers enregistrements intracellulaires chez les vertébrés (Brock et al. 1952). Les premières expériences en mesure de courant en potentiel imposé ou "voltage-imposé" ont été réalisées lors d'enregistrements intracellulaires. Le voltage-imposé permet de fixer et de maintenir la

membrane de la cellule à un potentiel donné, et de mesurer les courants présents en réaction à ce maintien à un potentiel fixe. Cette technique a donc permis d'étudier ces courants dans l'axone géant de calmar, et de mettre en évidence la présence de courants ioniques dépendants du voltage et responsables de la génération des potentiels d'action (Cole 1949, Marmont 1949, Hodgkin and Huxley 1952). Les cellules de mammifères, beaucoup plus petites, sont devenues accessibles à ce genre d'enregistrements grâce au développement de microélectrodes de verre tiré (Ling and Gerard 1949) à la pointe assez fine (d'où le terme "sharp electrode") pour pouvoir pénétrer la membrane des cellules sans trop de lésions (Fig. 2.2 B). En revanche, étant donné leur pointe fine, ces électrodes ont généralement une importante résistance (25 - 125 MΩ), ce qui peut induire un niveau de bruit important dans les enregistrements, ainsi que des non-linéarités (Purves 1981). De plus, le contact, appelé "seal", entre ce type d'électrode et la membrane de la cellule n'est pas optimal, entraînant un courant de fuite additionnel (Staley et al. 1992). C'est, entre autre, le changement de la forme des électrodes qui va permettre l'évolution des enregistrements intracellulaires vers les enregistrements utilisant la technique du patch-clamp.

2.1.4 La technique du patch-clamp

2.1.4.a. Historique et applications

Le voltage-imposé nécessite deux électrodes : une permettant d'injecter le courant nécessaire à maintenir la cellule à un potentiel donné, et une autre d'enregistrement. Pour cette raison, ce type d'enregistrements restait difficile d'application dans de petites cellules. Un système fut alors développé pour pouvoir alterner l'injection et la mesure du voltage via la même électrode (Brennecke and Lindemann 1971) quelques années avant la mise au point de la technique du patch-clamp, permettant dans un premier temps d'enregistrer les courants passant par des canaux ioniques uniques par apposition de la pointe de l'électrode sur la surface de la membrane de la cellule (Neher and Sakmann 1976). Plus tard, l'introduction du "gigaseal", permettant un contact puissant et stable, de résistance importante (10 - 100 GΩ), entre l'électrode et la membrane de la cellule, permis de mesurer le courant en potentiel imposé en utilisant une seule et même électrode et ce avec de faibles niveaux de bruit (Sigworth and Neher 1980). Plusieurs variations de la méthode du patch-clamp sont alors développées, et notamment les enregistrements en configuration "cellule-entière" (ou whole-cell), au cours desquels la membrane de la cellule est rompue pour pouvoir effectuer un enregistrement intracellulaire de manière similaire à la méthode utilisant des électrodes à pointes fines, mais avec une meilleure résistance d'accès et une diminution du niveau de bruit (Fig. 2.2 B). En 1991, Erwin Neher et Bert Sakmann reçoivent le Prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs découvertes.

Plusieurs configurations de patch-clamp existent :

- Cellule-attachée (cell-attached), permettant d'isoler les courants d'un seul canal ionique sans perturber la composition du cytoplasme et en perturbant au minimum le cytosquelette de la

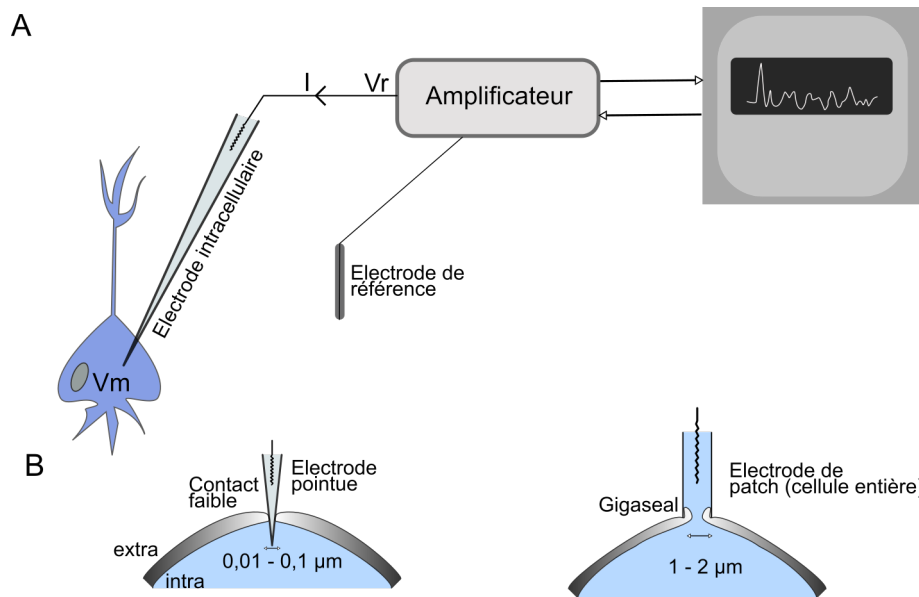


Fig. 2.2.: Configuration des enregistrements intracellulaires et cellule-entière. (A) Une électrode intracellulaire est insérée dans le corps cellulaire d'un neurone et est connectée à un amplificateur, qui compare le potentiel de la cellule enregistré (V_r) avec celui de l'électrode de référence. L'amplificateur est connecté à un ordinateur, affichant le signal enregistré. (B) Les électrodes pointues ont une pointe fine alors que les électrodes de patch-clamp ont une ouverture plus large leur permettant un meilleur contact avec la membrane de la cellule. Reproduit depuis (Brette and Destexhe 2012)

cellule (Fig. 2.3 A B)

- Détachée face interne vers l'extérieur (inside out), utilisée pour étudier l'activité d'un canal ionique unique (Fig. 2.3 C)
- Détachée face externe vers l'extérieur (outside out), utilisée pour étudier l'activité d'un canal ionique nécessitant la fixation d'un ligand (Fig. 2.3 E F)
- Cellule-entière (whole-cell), permettant d'effectuer des enregistrements en voltage- ou courant-imposé de la totalité de la cellule (Fig. 2.3 D).

Dans le reste de ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement à la technique de patch-clamp en configuration cellule-entière. Cette technique peut s'utiliser en voltage-imposé ou en courant-imposé. En voltage-imposé, on mesure les courants traversant la membrane de la cellule en imposant un potentiel fixe à cette cellule, en courant-imposé, on impose un courant (ou non) à la cellule et mesure son potentiel de membrane.

Patch-clamp en configuration cellule-entière. L'enregistrement en cellule-entière est réalisé après la rupture du morceau de membrane isolé par la pipette de patch, ce qui permet de former un contact entre l'intérieur de la cellule et l'intérieur de la pipette. Après formation d'un gigaseal, les courants transitoires associés à la capacité de l'électrode sont compensés, puis le potentiel de l'intérieur de la pipette est ajusté à un niveau similaire au potentiel de membrane théorique de la cellule (généralement -70 mV). La capacité représente la quantité de charge électrique portée par un conducteur pour un potentiel électrique donné. Pour pouvoir rompre la membrane de la cellule, on applique une pression négative à l'intérieur de la pipette,

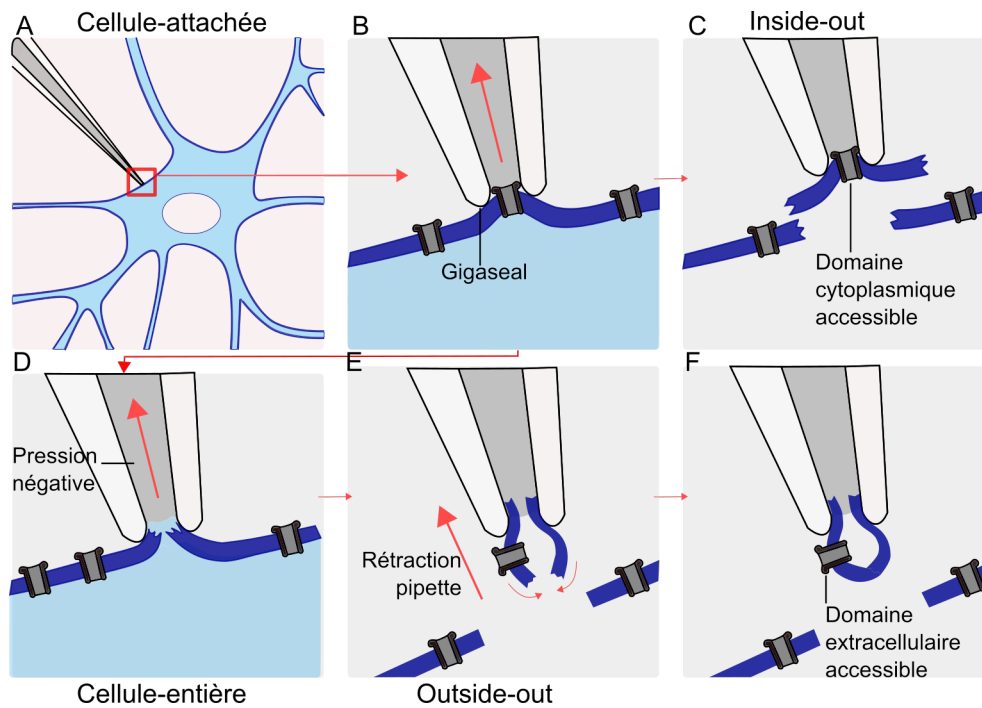


Fig. 2.3.: Différentes configurations de la technique de patch-clamp. (A) La pipette de patch est en contact avec la membrane du corps cellulaire du neurone, et ce contact, de résistance importante, est appelé gigaseal (B). L'enregistrement s'effectue alors en cellule-attachée. Si la membrane est rompue des deux côtés de la pipette, il est possible d'enregistrer le courant traversant un seul canal ionique, en configuration inside-out (l'intérieur de la cellule est accessible à l'expérimentateur). Si une pression négative est exercée à l'intérieur de la pipette en configuration cellule-attachée, il est possible de rompre la membrane du neurone et d'avoir accès à l'intérieur de la cellule, on entre en configuration cellule-entière (D). Si la pipette est rétractée lentement, la membrane se rompt (E) et peut se refermer (F), permettant un enregistrement en configuration outside-out (l'extérieur de la cellule est accessible à l'expérimentateur).

tout en enregistrant la réponse de la membrane à des pulses de voltage de quelques millivolts d'amplitude. Lorsqu'apparaissent d'importants courants transitoires de capacité au début et à la fin de ce pulse, la membrane de la cellule a été rompue et les différentes résistances (en séries et d'entrée) peuvent être mesurées (Fig. 2.4).

Lors d'une expérience standard de voltage-imposé, le but est de maintenir le potentiel de membrane de la cellule à un potentiel imposé par l'expérimentateur, et de mesurer le courant nécessaire pour maintenir ce voltage fixe. Cependant, les résistances en séries, égales à la somme de la résistance de la pipette et la résistance d'accès à la cellule, empêchent de maintenir et contrôler parfaitement le voltage de la cellule. Ces résistances limitent la quantité de courant pouvant être utilisé pour charger la membrane, ce qui signifie que le voltage réel à l'intérieur de la cellule est différent et supérieur au voltage théoriquement imposé (Sigworth 1983, Armstrong and Gilly 1992). *In vivo*, la résistance d'accès est généralement non-négligeable et plus élevée que lors d'enregistrements *in vitro* (jusqu'à 100 M Ω *in vivo* contre moins de 20 M Ω *in vitro*), parce qu'il est plus difficile de garder la pipette sans débris à cause des mouvements du tissu cérébral, et d'apposer la pipette de la façon la plus optimale sur le soma du neurone sans contrôle visuel (Petersen 2017).

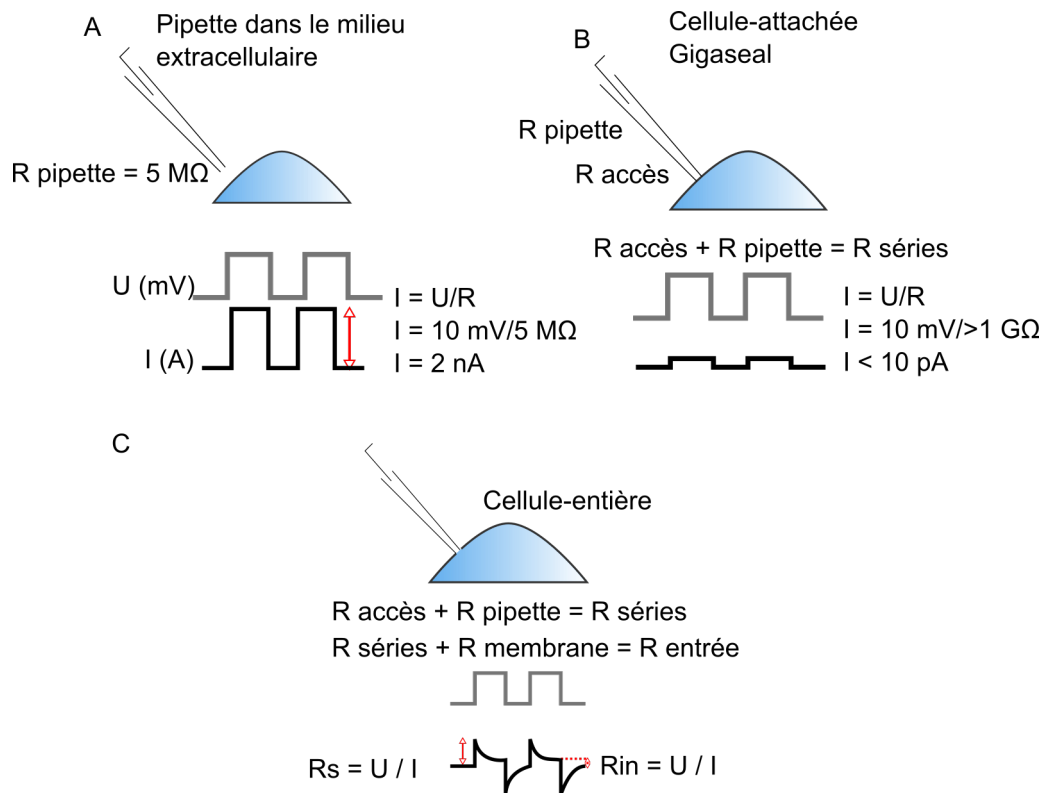


Fig. 2.4.: Etapes des enregistrements en configuration cellule-entière. (A) La pipette de patch est approchée du neurone, des steps de voltage (ici 10 mV) sont appliqués via l'électrode à l'intérieur de la pipette, et le changement de courant induit par ce voltage est enregistré. La résistance de la pipette peut alors être calculée grâce à la loi d'Ohm. (B) La pipette entre en contact avec la membrane d'un neurone et un gigaseal est formé. La résistance mesurée par l'électrode (R_s) est égale à la somme de la résistance de la pipette et la résistance d'accès au contact de la membrane. (C) Une pression négative permet de rompre la membrane et d'entrer en configuration cellule-entière. Les pulses de voltage entraînent alors le chargement de la membrane neuronale et les résistances en série (R_s) et d'entrée (R_{in}) peuvent être calculées grâce aux courants évoqués par les pulses de voltage.

Une autre limite des enregistrements en voltage-imposé *in vitro* et *in vivo* provient de la géométrie des neurones. En effet, les neurones reçoivent une majorité d'information le long de leur arbre dendritique, avant que les potentiels synaptiques n'atteignent le soma. Étant donné la géométrie complexe des neurones, le potentiel dans l'intégralité de l'arbre dendritique n'est généralement pas uniformément contrôlé à l'aide d'une unique électrode positionnée au niveau du soma. De ce fait, les paramètres des entrées synaptiques inhibitrices et excitatrices sont déformés proportionnellement à leur distance sur l'arbre dendritique par rapport au soma (Williams and Mitchell 2008, Armstrong and Gilly 1992, Spruston et al. 1993).

Connaissant ces différentes limites, les enregistrements réalisés *in vivo* pour l'obtention des résultats de ce mémoire ont été effectués en courant-imposé, permettant d'enregistrer le potentiel de membrane de la cellule. Cela diminue de ce fait les erreurs provenant de la résistance d'accès, car la quantité de courant injecté reste constante, et l'erreur engendrée par la résistance d'accès peut être compensée. Cependant il convient de noter que lorsque du courant est injecté pour maintenir la cellule à un potentiel physiologique, ce courant a de fortes chances de n'influencer

fortement que la partie du neurone proche de la pipette de patch, et d'être atténué en atteignant les régions plus distales du neurone.

2.1.4.b. La technique du patch-clamp *in vivo*

Le gigaseal, formé entre la pipette de patch et la membrane d'un neurone, est remarquablement stable mécaniquement. Cette propriété a rendu possible les enregistrements de patch-clamp *in vivo* (Margrie et al. 2002). La technique d'enregistrement *in vivo* dite "à l'aveugle" repose sur les mêmes principes que la technique *in vitro*. La pipette de patch est connectée à un système de pression extérieur qui permet à l'expérimentateur d'appliquer une pression positive à la pointe de la pipette pour la garder propre lors de la descente dans le tissu cérébral. Cette pression se situe généralement aux alentours de quelques centaines de millibars (100-200 mbar). Une fois la profondeur désirée atteinte (typiquement pour CA3, de 2000 à 2200 μm), cette pression est diminuée à quelques dizaines de mbar (< 20 mbar), et réduite à zéro lors d'un contact avec la membrane d'un neurone (Fig. 2.5). Ce contact peut être visualisé indirectement, car le courant engendré par un pulse de voltage constant diminue soudainement (augmentation de la résistance de la pipette), et oscille à des fréquences correspondant au rythme cardiaque de l'animal (Fig. 2.5). Une partie de la membrane du neurone entre alors en contact avec la pipette, et la résistance entre l'électrode et la solution extracellulaire augmente. Le verre de la pipette et la membrane forment un contact qui entraîne l'augmentation rapide de la résistance de la pipette, jusqu'à atteindre plusieurs gigaohms. Un gigaseal est alors formé avec la membrane, et la configuration "cellule-attachée" de la méthode du patch-clamp est atteinte (Fig. 2.5). Le potentiel de l'électrode de patch est alors diminué jusqu'au potentiel théorique de potentiel de membrane de repos de la cellule (typiquement -70 mV). Une pression négative est ensuite appliquée à l'intérieur de la pipette de patch pour rompre la membrane sans affecter le gigaseal (Fig. 2.5). La solution à l'intérieur de la pipette est en contact direct avec le milieu intracellulaire, et les courants traversant la membrane peuvent être mesurés en minimisant les courants de fuite grâce au gigaseal. Dans la configuration cellule-entière, les pulses de voltage entraînent des courants transitoires importants dus au chargement de la capacité de la membrane. Le courant à l'état d'équilibre (steady-state) est également plus important que dans la configuration cellule-attachée, ce qui reflète une plus grande conductance provenant de la membrane de la cellule-entière en comparaison avec seulement un morceau de la membrane au niveau du bout de la pipette en cellule-attachée (Fig. 2.5). Pour pouvoir mesurer différentes propriétés telles que l'excitabilité, le patron de décharge, la résistance d'entrée, et des conductances intrinsèques du neurone, il est possible d'injecter des pulses de courant dans la cellule. Ces propriétés peuvent être modulées lors de différents états cérébraux et comportementaux.

Ce type d'enregistrement peut être effectué chez l'animal anesthésié (Margrie et al. 2002, Atallah and Scanziani 2009, Kowalski et al. 2016, Zucca et al. 2017), mais également chez l'animal éveillé (Petersen et al. 2003, Poulet and Petersen 2008, Harvey et al. 2009, Epsztein et al. 2010, Epsztein et al. 2011, Polack et al. 2013, Schmidt-Hieber et al. 2013, Schneider et al. 2014, Bittner

et al. 2015, Einstein et al. 2017, Hulse et al. 2016, Hulse et al. 2017, Schmidt-Hieber and Nolan 2017) ce qui permet de corrélérer directement le comportement de l'animal ainsi que son état cérébral et d'éveil global avec l'activité des neurones, étape essentielle pour la compréhension du fonctionnement du système nerveux central. En effet, dans les cortex visuel, auditif et somatosensoriel, les états cérébraux et comportementaux de l'animal modifient l'intégration synaptique des neurones. Lorsque l'animal est en état d'éveil et de vigilance, les neurones du cortex visuel ont un ratio signal/bruit et un gain modifié par des signaux neuromodulateurs (Polack et al. 2013). De manière similaire, l'état cérébral interne régule dynamiquement le potentiel de membrane et sa synchronisation lors de différents comportements, définissant plusieurs modes de fonctionnement cortical (Poulet and Petersen 2008). Dans le cortex auditif, les neurones intègrent différemment les sons en fonction du comportement locomoteur de l'animal, ce qui faciliterait les comportements guidés par l'audition (Schneider et al. 2014). Dans la formation hippocampique, ce type d'expérience a permis de mettre en évidence les mécanismes cellulaires sous-tendant la navigation spatiale. Dans le CE, les cellules de grille se dépolarisent lentement jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action lors du passage de l'animal dans le champ de décharge du neurone (Schmidt-Hieber et al. 2013). Les cellules de grille déchargent à différents endroits de l'environnement et forment un ensemble de sommets de triangles équilatéraux qui permettent de définir un espace (Hafting et al. 2005).

Pour réaliser ces expériences, il faut pouvoir obtenir des enregistrements stables chez l'animal éveillé, et de ce fait minimiser les mouvements du cerveau par rapport à la pipette d'enregistrement. Pour ce faire, une barre de tête est généralement implantée sur le crâne de l'animal anesthésié pour permettre la fixation de l'animal sans douleur et sans stress (après habituation) lors des enregistrements électrophysiologiques (voir 2.2.1 et 2.2.2).

2.2 Enregistrements chez l'animal éveillé tête-fixée

Dans le but d'étudier l'activité des CP de CA3 chez l'animal éveillé en fonction des différents états physiologiques et comportementaux de l'animal, nous avons réalisé des enregistrements *in vivo* en configuration cellule-entière chez l'animal éveillé tête-fixée. Lors de ces expériences, une barre de tête était d'abord fixée sur le crâne de l'animal anesthésié. Après cette chirurgie, et un délai post-opératoire nécessaire à la récupération, l'animal était habitué à être fixé quotidiennement. Pendant cette habituation, l'animal est libre de courir sur une roue et de s'arrêter à tout moment. Enfin, le jour de l'expérience, une craniotomie était réalisée sous anesthésie au dessus de CA3, avant de réaliser les enregistrements du LFP local et de cellule unique de CP de CA3. Simultanément, nous avons enregistré le comportement locomoteur de l'animal ainsi que le diamètre de sa pupille.

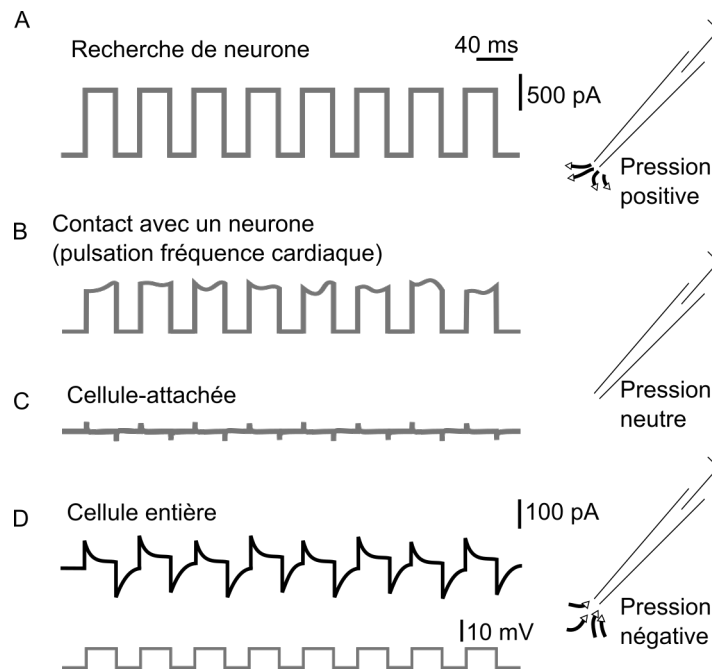


Fig. 2.5.: Enregistrements en cellule-entière in vivo. Une pression positive est appliquée au bout de la pipette lors de la descente de l'électrode dans le tissu cérébral (A). Une fois la profondeur de la couche de cellules pyramidales atteinte, cette pression est diminuée à 20 mbar jusqu'à contact avec un neurone (B). La pression est enlevée pour permettre la formation du gigaseal entre la pipette et le neurone. La formation du gigaseal peut être favorisée par l'injection lente de courant négatif. Une fois le gigaseal formé (C), une pression négative inférieure à 100 mbar est exercée pour rompre la membrane et entrer en configuration cellule-entière (D). Reproduit depuis (Margrie et al. 2002).

2.2.1 Implantation de barres de tête

Pour pouvoir obtenir des enregistrements chez l'animal éveillé tout en minimisant les mouvements du cerveau par rapport à la pipette d'enregistrement, il est nécessaire de fixer une pièce en métal sur le crâne de l'animal pour pouvoir le maintenir tête fixée. Dans ce but, nous avons fabriqué des barres de tête en acier inoxydable (35x3x3 mm). Ces barres étaient ensuite cimentées sur le crâne de souris âgées de 4 à 5 semaines, à l'aide de ciment Superbond (Phymep) et de ciment dentaire acrylique (Dentalon, Phymep). Les animaux étaient maintenus sous anesthésie à l'isoflurane pendant la chirurgie. Le crâne sous la barre de tête était recouvert d'une couche de superbond, excepté l'endroit de la future craniotomie au dessus de CA3. Cette position était marquée à l'encre à l'aide de coordonnées stéréotaxiques par rapport au bregma (2,0 mm postérieur et 2,0 mm latéral depuis le bregma).

2.2.2 Habituation des animaux

L'habituation des animaux débutait au moins 48h après l'implantation de la barre de tête. Les animaux étaient contrôlés et pesés tous les jours, depuis la chirurgie jusqu'aux enregistrements. Généralement, la prise de poids recommençait dès le 2ème jour après la chirurgie. Le premier jour

d'habituation, les animaux n'étaient pas fixés, mais libres d'explorer pendant 15 minutes la roue d'activité au-dessus de laquelle ils allaient être fixés les jours suivants. Le premier jour de fixation, les animaux étaient fixés 10 minutes. Puis le temps de fixation était graduellement augmenté chaque jour : 30 minutes jour 2, 60 minutes jour 3, 120 minutes jour 4. Par la suite, les animaux étaient habitués à être fixés sur la roue d'activité 120 minutes par jour. Au minimum le dernier jour d'habituation avant enregistrement, les animaux étaient fixés sur la roue principale, autour de laquelle étaient réalisés les enregistrements électrophysiologiques. Ils étaient également habitués aux sources de lumières ambiantes, et aux bruits relatifs à l'expérience. Une fois que les animaux ne montraient plus de signes distinctifs de stress excessif (tentative de fuite, immobilité, crispation, miction/défécation excessive, vocalisation) et qu'ils étaient capables de courir et de s'arrêter sur la roue d'activité, ils étaient considérés comme habitués. Ce processus d'habituation pouvait prendre de 2 à 10 jours.

2.2.3 Enregistrements des variables physiologiques et comportementales

Pour pouvoir étudier et corrélérer les états physiologique et comportemental de l'animal avec l'activité intracellulaire et extracellulaire dans CA3, nous avons enregistré le comportement locomoteur de l'animal ainsi que les variations du diamètre de sa pupille lors de l'expérience. Au cours du comportement locomoteur, le rythme theta est présent dans l'hippocampe. Nous avons donc pu étudier l'activité intracellulaire des CP de CA3 pendant les oscillations theta associées ou non à la locomotion. Le diamètre de la pupille de l'animal est également modulé par l'état d'éveil de l'animal (Reimer et al. 2014). Les fluctuations du diamètre pupillaire permettent donc de mieux caractériser chaque état cérébral et d'étudier si au cours d'un même état, des changements discrets d'éveil et donc du diamètre de la pupille peuvent être corrélés à des modulations intracellulaires des CP de CA3.

Le comportement locomoteur de l'animal était enregistré à l'aide du logiciel Poly Wheel (Imetronic, France) à une fréquence de 32 Hz. La course était détectée après que l'animal ait passé un capteur infrarouge. Seize capteurs étaient positionnés sur la roue de 20 cm de diamètre. L'extraction de la vitesse de l'animal au cours de l'enregistrement était effectuée à l'aide du logiciel Poly Wheel.

Le diamètre de la pupille de l'animal a été enregistré dans un ensemble d'animaux ($n=11/30$). Pour enregistrer l'œil de l'animal pendant l'expérience, l'animal était éclairé à l'aide d'une lumière infrarouge (850 nm), et l'image collectée avec une caméra sensible à l'infrarouge (DALSA GENIE NANO-M1280-NIR) à 10 Hz.

2.3 Contrôles post-hoc

Lors d'enregistrement en configuration cellule-entière, le milieu à l'intérieur de la pipette diffuse dans la cellule enregistrée. Si dans cette solution est ajoutée de la biocytine, alors cette-dernière va également diffuser dans la cellule, d'abord dans le soma, puis dans les dendrites et les axones. A la fin de l'enregistrement, l'électrode de patch est retirée lentement. A ce moment-là, la membrane du neurone se referme également, laissant le neurone enregistré intact. Ensuite, le cerveau de l'animal est fixé chimiquement par du paraformaldéhyde (PFA), avant d'être sectionné en tranches fines. Le neurone enregistré peut alors être marqué en appliquant de l'avidine conjuguée à des molécules fluorescentes comme la GFP (green fluorescent protein) (Horikawa and Armstrong 1988).

Lors de nos expériences, les cerveaux étaient fixés une semaine à 4°C dans une solution contenant 4% de PFA dans du PBS 1X (phosphate buffer serum). Les cerveaux étaient ensuite sectionnés à l'aide d'un vibratome en tranches de 100 μm et lavées trois fois dans une solution de PBS 1X et de Triton (détergent) X-100 pour perméabiliser les membranes neuronales. Les tranches étaient ensuite incubées une nuit à 4° C dans une solution de streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 488 et diluée au 1:1000. Après incubation, les tranches étaient à nouveau lavées dans du PBS 1X avant d'être montées entre lame et lamelle pour observation au microscope à fluorescence.

2.4 Analyses des données et statistiques

Les scripts ayant servi aux analyses des données (développés sous Python) sont disponibles sur demande.

Analyse du potentiel de membrane. Pour pouvoir étudier les changements du potentiel de membrane (V_m) des CP de CA3 en fonction de différents paramètres, nous avons d'abord détecté puis enlevé les potentiels d'action du signal du potentiel de membrane. Les potentiels d'actions sont détectés lorsque la dérivée du potentiel de membrane (dV/dt) dépasse 5 mV/ms. Pour pouvoir obtenir une estimation prudente du V_m moyen, les potentiels d'action et leur dépolarisations sous-jacentes telles que les potentiels en plateau, étaient supprimés. Le signal dépourvu de potentiel d'action était ensuite lissé en utilisant une moyenne mobile sur 2 secondes, pour supprimer les fluctuations transitoires du signal. La fréquence d'échantillonnage du signal lissé était ensuite diminuée à 20 Hz.

Pour analyser la variance du potentiel de membrane, le signal lissé du V_m était soustrait du signal V_m sans potentiel d'action, de manière à filtrer les oscillations lentes, et donc à obtenir le " V_m résiduel". A partir de ce V_m résiduel, la variance du signal était calculée en utilisant une variance mobile sur une fenêtre de 1 seconde de la même façon que la moyenne mobile utilisée précédemment. Le signal résultant était ensuite lissé en utilisant une moyenne mobile avec une fenêtre de 2 seconde, et sa fréquence d'échantillonnage diminuée à 20 Hz.

Analyse du LFP. La fréquence d'échantillonnage du signal du LFP était diminuée à 2000 Hz puis

le signal était filtré en utilisant un filtre de Butterworth, entre 0,2 Hz et 100 Hz. Après ce filtre, la fréquence d'échantillonnage du signal était à nouveau diminuée à 200 Hz. Un spectrogramme était ensuite créé à l'aide de transformation de Fourier rapides consécutives pour transformer les données discrètes du domaine temporel dans le domaine fréquentiel. Depuis ce spectrogramme, la puissance des fréquences du rythme theta (6-9 Hz), delta (0,5-3,5 Hz), et gamma (30-50 Hz) lors des enregistrements étaient extraites.

Classification des états cérébraux. Le début de l'épisode du rythme theta était détecté lorsque le ratio theta/delta était supérieur à la moyenne, et pour pouvoir être compté comme une période theta, cette période devait être supérieure à 1 seconde et le ratio theta/delta devait être supérieur à 1 écart-type au-dessus de la moyenne au moins une fois au cours de la période détectée. Si deux périodes theta étaient séparées de moins d'une seconde, elles étaient réunies et considérées comme une seule et même période. Le début d'une période de LIA était détecté lorsque la puissance du LFP entre 0,5 Hz et 80 Hz était supérieure à la moyenne de la puissance du signal de LFP. Pour être classées comme LIA, les périodes de LIA devaient durer au moins 2 secondes et avoir une puissance de LFP supérieure à 0,25 écart-type au-dessus de la moyenne au moins une fois au cours de la période détectée. Si deux périodes de LIA étaient séparées de moins de 0,5 secondes, elles étaient réunies et considérées comme une seule et même période.

Diamètre pupillaire. Pour analyser le diamètre de la pupille de l'animal au cours de l'expérience, les images provenant des vidéos étaient extraites. Ces images étaient ensuite converties pour diminuer les artéfacts. Le contraste des images était augmenté, et les cercles contenus dans ces images étaient détectés. Le diamètre de ces cercles et donc de la pupille était calculé automatiquement.

Statistiques. Sauf indication contraire, les données présentées dans la partie Résultats de ce mémoire sont exprimées par la médiane $\pm$ la dérivation absolue moyenne autour de cette médiane, calculée en soustrayant chaque point de la médiane du groupe, puis en prenant leur valeur absolue, et en les additionnant avant de les diviser par le nombre de points total. Ces mesures de tendance et de variation centrales ont été utilisées parce qu'une grande partie des distributions des données ne suivaient pas une loi normale. Lors de la comparaison de 2 groupes, la méthode de bootstrapping a été appliquée. Brièvement, les données des deux groupes étaient aléatoirement ré-échantillonnées, en autorisant le remplacement, pour former deux groupes substitués. Cette procédure était répétée 1000 fois, et si la différence des médianes était supérieure à 95% des répétitions des groupes substitués, alors les groupes étaient considérés significativement différents. Lors de la comparaison de 3 groupes ou plus, un test Kruskal-Wallis était utilisé pour déterminer la présence d'une différence significative entre différents groupes, avant d'utiliser un bootstrap entre chaque paire de groupe, 2 à 2. Un test bootstrap différent était utilisé lors de la comparaison de deux groupes non-indépendants. Dans ce test, la différence entre les valeurs appariées (paired) était aléatoirement déterminée comme étant soit positive ou négative, 1000 fois. Si la moyenne des différences des données réelles était supérieure à 95% des moyennes des données générées aléatoirement, les groupes appariés étaient considérés comme

étant significativement différents. Pour les graphiques représentant des nuages de points où les variables lors de différents états étaient comparées, un test de Mann-Whitney U était utilisé pour déterminer s'il existait une différence significative entre les états pour cette cellule spécifique (cette différence significative est représentée par des cercles remplis dans les graphiques). Pour pouvoir déterminer si un événement spécifique était associé à un changement significatif du potentiel de membrane V_m , une fenêtre de 2 secondes du signal du potentiel de membrane (dont la fréquence d'échantillonnage était diminuée à 20 Hz) aux alentours du commencement de l'événement était comparée à l'aide d'un t-test de Welch. Pour les périodes de theta, la comparaison était effectuée entre -2,5 à -0,5 et 0,5 à 2,5 secondes par rapport au commencement de l'événement. Pour les périodes de LIA, les fenêtres étaient prises entre -4 à -2 et -1 à 1 secondes. Les événements aux valeurs p inférieures à 0,05 étaient considérés comme étant hyper- ou dépolarisant selon la direction du changement du potentiel de membrane. Pour déterminer si les proportions d'événements d'hyperpolarisation, de dépolarisation ou sans changement du potentiel de membrane pourraient être dues au hasard, nous avons utilisé une méthode de bootstrapping. Pour chaque enregistrement, les temps réels des événements étaient remplacés par des temps générés aléatoirement, et la méthode décrite précédemment était utilisée pour déterminer si chaque temps aléatoire était associé à une hyperpolarisation, une dépolarisation ou avec aucun changement. Ce processus était répété 1000 fois pour créer une distribution des proportions. Les proportions réelles étaient considérées significativement différentes du hasard lorsqu'elles étaient supérieures ou inférieures à 95% de l'ensemble de proportions généré aléatoirement. Pour déterminer si une cellule présentait un changement consistant au début d'un état spécifique, nous avons également utilisé la méthode du bootstrap. Le long d'une même session d'enregistrement, le potentiel de membrane et les temps associés étaient décalés dans le temps les uns par rapport aux autres, 6000 fois avec des incréments de 50 ms. Pour chaque décalage, le changement moyen du potentiel de membrane associé avec le début de l'événement était calculé pour la cellule. Les neurones étaient considérés comme significativement hyperpolarisant ou dépolarisant lorsque le changement moyen du potentiel de membrane était supérieur à 95% des changements moyens des données générées aléatoirement.

OBJECTIFS

Objectifs de la recherche

3.1 Définition du périmètre

Des changements durables de l'activité de circuits synaptiques permettent le stockage de patrons d'activité électrique dans des ensembles neuronaux précisément distribués. Ces changements seraient à l'origine de l'encodage de la mémoire. Des modèles computationnels de la mémoire proposent que cet encodage a lieu dans les circuits de CA3 dont l'architecture unique permettrait le stockage et le rappel rapide de souvenirs associatifs. Le réseau dense d'interconnexions entre les cellules principales de CA3 formeraient un réseau attracteur qui favoriserait ces processus. Pour pouvoir réaliser ce type d'opération cognitive complexe, il est nécessaire de recruter, coordonner et synchroniser précisément l'activité des neurones. En effet, il est peu probable que des neurones individuels soient capables seuls de remplir ce genre de fonctions (Quiroga 2013). L'activité synchronisée d'un nombre important de neurones entraîne des courants qui s'additionnent pour générer des fluctuations de forte amplitude présentes dans le LFP local. Ces fluctuations sont rythmiques et ont différents corrélats physiologiques et comportementaux, et serviraient donc différentes fonctions. Le rythme theta est observé lorsque le LFP oscille à des fréquences entre 6 et 12 Hz. Il est présent lors de périodes d'exploration pendant les états de veille, et permettrait au cerveau d'intégrer et de stocker de nouvelles informations (Colgin 2013). Pendant les périodes de repos lors des états de veille, la LIA est présente, ponctuée par les sharp wave-ripples, qui permettent de stabiliser et de consolider les informations précédemment apprises (O'Neill et al. 2010). La capacité des circuits à générer ce genre d'activité rythmique reposerait sur la modulation, en fonction de l'état cérébral, des propriétés de neurones individuels, telles que le potentiel de membrane au repos, la distance entre ce potentiel et le seuil de déclenchement des potentiels d'action, la fréquence de décharge des neurones, l'efficacité synaptique ainsi que la capacité à intégrer les informations synaptiques (Hulse et al. 2016, Hulse et al. 2017, Polack et al. 2013, Schmidt-Hieber and Nolan 2017).

3.2 Objectifs

Étant donné l'architecture et les fonctions de CA3 exposées précédemment, nous pouvons émettre l'hypothèse que la modulation de l'activité de neurones individuels au cours de différentes oscillations du LFP permet aux circuits d'encoder, de stocker et de rappeler de manière efficace les informations pertinentes pour un individu.

À ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'activité intracellulaire de neurones individuels de CA3 chez l'animal éveillé. Cela peut s'expliquer par la difficulté d'enregistrer en configuration cellule-entière des neurones dans un réseau intact, de plus chez l'animal éveillé. Cette difficulté, inhérente à la technique du patch-clamp, est d'autant plus vraie que CA3 est une structure relativement profonde (2000 - 2200 μm chez la souris) et donc difficile d'accès. Malgré ces limitations, les enregistrements en configuration cellule-entière représentent à ce jour la seule technique permettant d'avoir accès aux informations d'entrée et de sortie d'un neurone individuel. Dans le but d'étudier la modulation intracellulaire des CP de CA3 ayant lieu durant différents rythmes oscillatoires hippocampiques caractéristiques des états de veille (theta et LIA), et de les corréler avec le comportement et l'état d'éveil de l'animal, nous avons réalisé des enregistrements simultanés en configuration cellule-entière des CP de CA3 et de l'activité oscillatoire du LFP dans CA3 chez l'animal éveillé tête-fixée. Nous avons combiné ces enregistrements avec l'analyse du comportement locomoteur et du diamètre pupillaire des animaux. Cette étude est la première à mettre en évidence les dynamiques intracellulaires des cellules principales de CA3 chez l'animal éveillé.

RÉSULTATS

Résultats - Discussion

Article :

"Intracellular dynamics of CA3 pyramidal cells across brain states"

Meryl Malezieux^{1,2*}, Ashley L. Kees^{1,2*} and Christophe Mulle^{1,2}

¹Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297

²University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

*equal contribution

En préparation

4.1 Problématique

La dynamique du potentiel de membrane des CP de CA3 n'a été enregistrée que chez l'animal anesthésié (Kowalski et al. 2016, Zucca et al. 2017). A ce jour, il n'existe pas de données quant à l'activité intracellulaire des CP de CA3 lors de différents états de veille, contrairement à d'autres régions de la formation hippocampique telles que CA1 et le GD. Cependant, CA3 possède des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles uniques. Les données et théories computationnelles suggèrent que CA3 permet la formation et le stockage rapide de la mémoire épisodique grâce à la plasticité synaptique ayant lieu aux connexions CA3-CA3 (Kesner and Rolls 2015). Les CP de CA3 intègrent des informations spatiales et non-spatiales via des entrées spécifiques aux propriétés fonctionnelles et anatomiques uniques (i.e. le réseau associatif de CA3, les voies perforantes directe et indirecte passant par le GD, et les fm des CG du GD). De plus, CA3 est impliqué dans la génération des oscillations gamma et des SWR, importantes pour l'encodage et la consolidation de la mémoire, respectivement (Csicsvari et al. 2000, Bazelot et al. 2016, Csicsvari et al. 2003, Hajos et al. 2004, Bazelot et al. 2010). Etant donné que des états de veille spécifiques permettent différentes étapes de la formation de la mémoire, et l'importance des circuits de CA3 pour l'encodage et le rappel de souvenirs épisodiques, nous émettons l'hypothèse que des changements de propriétés intracellulaires des CP de CA3 jouent un rôle dans la capacité qu'a CA3 de réaliser des fonctions mnésiques distinctes. Pour répondre à cette question, nous avons exploré la modulation intracellulaire des CP de CA3 lors de changements d'état de veille, en utilisant des enregistrements de patch-clamp en configuration cellule-entière chez la souris

éveillée tête-fixée, en combinaison avec des mesures du diamètre pupillaire, de la vitesse de locomotion, et des enregistrements de l'activité oscillatoire du LFP de CA3.

4.2 Résultats

Pour étudier les dynamiques intracellulaires des CP de CA3 *in vivo*, nous avons d'abord caractérisé et classé les différents états cérébraux enregistrés dans le LFP de CA3. Une électrode était positionnée dans le *stratum pyramidale*, où pouvaient être enregistrées (i) de fortes SWR de polarité positive lors de périodes de repos, et (ii) des oscillations theta lors de périodes de locomotion. La classification des différents états cérébraux était effectuée après les expériences, en utilisant le spectrogramme du LFP pour détecter des périodes de theta et de LIA. Certaines périodes de theta avaient lieu en conjonction avec une période de locomotion (run theta), alors que d'autres périodes n'étaient pas directement associées à des périodes de locomotion (rest theta). Les périodes de theta associées avec la locomotion étaient plus longues que les autres périodes de theta et de LIA. L'ensemble des oscillations theta étaient également plus fréquentes que les périodes de LIA. Le diamètre de la pupille de l'animal était plus faible pendant les périodes de LIA par rapport aux périodes de theta, en accord avec la littérature (Hulse et al. 2017), confirmant que les périodes de theta sont associées à un éveil plus important par rapport à la LIA. Pour les événements theta associés à la locomotion, le début de la période de theta précédait généralement la locomotion. Cette observation est en accord avec de précédentes études qui ont montré que le rythme theta émerge plusieurs centaines de millisecondes avant le début de la locomotion (Vanderwolf 1969, Green and Arduini 1954, Fuhrmann et al. 2015). De ce fait, le LFP de la couche pyramidale de CA3 présente des caractéristiques similaires à celui qui pouvait être enregistré dans CA1.

Nous avons étudié les propriétés intracellulaires des CP de CA3 pendant le rythme theta, rythme lors duquel s'effectue l'encodage de nouvelles informations. Nous avons donc émis l'hypothèse que pendant les oscillations theta, les propriétés des CP de CA3 changeraient de façon à optimiser l'intégration des informations provenant du GD et du CE. Nous avons analysé les changements du potentiel de membrane (V_m) ayant lieu lors des transitions au rythme theta. Nous avons observé une diminution du potentiel de membrane des cellules lors de la plupart des transitions. En moyenne, le potentiel de membrane des CP de CA3 était hyperpolarisé pendant le rythme theta. Cependant, les transitions individuelles pouvaient être associées à une hyperpolarisation, une dépolarisation ou bien aucun changement du potentiel de membrane. En comparaison avec des changements de V_m sélectionnés aléatoirement, theta était associé avec une proportion plus élevée d'hyperpolarisations, et moins élevée de dépolarisations et de changements non-significatifs, suggérant que le potentiel de membrane des CP de CA3 a tendance à s'hyperpolariser aux transitions au rythme theta. Aucune différence dans la distribution de la direction des changements du V_m des CP n'a été détectée entre les périodes de run theta et de rest theta, suggérant que la relation entre le potentiel de membrane et le rythme theta ne dépend pas du comportement locomoteur, mais dépend plutôt de l'état cérébral général. Cependant, une

proportion de CP enregistrées lors de nos expériences avait tendance à se dépolariser pendant le rythme theta. Nous avons alors classé les cellules en fonction de leur changement de potentiel de membrane aux transitions au rythme theta. La moitié des cellules enregistrées pouvaient être classées comme s'hyperpolarisant significativement pendant les rythmes theta, et 3 comme se dépolarisant. L'hyperpolarisation des cellules pendant le rythme theta était accompagné d'une diminution de la fréquence de décharge de ces cellules, et *vice versa* pour les cellules se dépolarisant. Ces résultats indiquent que pendant les périodes de theta, le potentiel de membrane d'une majeure partie des CP de CA3 est modulé, et tend à s'hyperpolariser, entraînant une diminution de la fréquence de décharge des cellules. Quelques CP se dépolarisent cependant, et augmentent leur fréquence de décharge. De ce fait, les modulations ayant lieu pendant le rythme theta dans les CP de CA3 ont un effet direct sur les informations de sortie de ces CP et auront donc un impact sur les régions situées en aval de CA3 telles que CA1 et CA3 même.

Nous avons effectué une analyse similaire pour caractériser les changements du potentiel de membrane lors de transitions aux périodes de LIA, un état cérébral caractérisé par la présence de SWR, jouant un rôle dans la consolidation de la mémoire. Nous avons émis l'hypothèse que pendant cet état, les propriétés des CP de CA3 devraient favoriser l'intégration des entrées récurrentes d'autres CP de CA3. En effet, nous avons observé que pendant les transitions à la LIA, les CP de CA3 présentaient une dépolarisation, suggérant qu'elles entrent dans un état plus excitable, permettant possiblement la génération de SWR. Cependant, de la même façon que lors de transitions aux rythmes theta, les réponses enregistrées étaient hétérogènes, avec certaines transitions à la LIA associées à une dépolarisation, d'autres à une hyperpolarisation et d'autres à aucun changement du potentiel de membrane. Seules 8 cellules ont pu être classées comme se dépolarisant significativement, et 2 cellules comme s'hyperpolarisant. Les cellules se dépolarisant augmentaient également leur fréquence de décharge. De plus, parmi les 8 cellules se dépolarisant, 7 s'hyperpolarisaient pendant les transitions au rythme theta, suggérant que c'est une combinaison de modulations fréquente. Les cellules s'hyperpolarisant lors de transitions à la LIA avaient également tendance à s'hyperpolariser pendant les rythmes theta. Cela suggère que quelle que soit la direction de la modulation ayant lieu pendant la LIA (dépolarisation ou hyperpolarisation), les cellules modulées ont tendance à s'hyperpolariser durant le rythme theta. Ces modulations ont un impact direct sur l'activité de décharge des cellules et influencent probablement le réseau de CA3 pour favoriser l'encodage d'information pendant les rythmes theta, et la génération des SWR pendant la LIA.

Les variations rapides de l'état cérébral cortical pendant les états de veille sont précisément corrélées avec des changements du diamètre pupillaire chez différentes espèces (McGinley et al. 2015, Reimer et al. 2014). Lors de nos expériences, la pupille des animaux était dilatée pendant les rythmes theta, et rétractée pendant les périodes de LIA. Ces dilatations et contractions s'étendaient pendant la durée de l'état cérébral. Cependant, les changements du diamètre de la pupille n'ont pas pu être corrélés avec les différentes modulations du potentiel de membrane des CP de CA3 lors de différents états cérébraux. De ce fait, même si le diamètre pupillaire est fortement corrélé avec l'état cérébral général, il ne permet pas de prédire la direction de la modulation intracellulaire du potentiel de membrane des CP de CA3 pendant ces états.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux possibles mécanismes pouvant expliquer la modulation

du potentiel de membrane observée pendant les différents états cérébraux. Dans un premier temps, nous avons examiné la corrélation entre le changement du potentiel de membrane et sa valeur initiale avant la transition d'état. Lors des transitions au rythme theta, plus la cellule était dépolarisée initialement, plus l'hyperpolarisation associée au rythme theta était grande. Cette corrélation suggère que la direction de la modulation pendant les transitions au rythme theta dépend de changements de la force motrice lors de différents potentiels de membrane. Nous avons injecté du courant dans les CP de CA3 pour les hyperpolariser et pour essayer d'inverser cette force motrice. De manière surprenante, l'injection de courant n'a pas modifié la proportion d'événements de dépolarisations, mais a eu pour effet d'augmenter de façon non-significative la proportion d'hyperpolarisations pendant les périodes de theta. Ce résultat pourrait être dû à la difficulté de contrôler le potentiel de membrane des neurones *in vivo*, en particulier le potentiel de leur compartiment les plus distaux. Une autre possibilité est que les changements observés pendant les période de theta sont plus complexes qu'une modification simple de la conductance d'une seule espèce d'ion. Pendant la LIA, les changements du potentiel de membrane ne sont que faiblement corrélés à la valeur initiale du potentiel de membrane, suggérant que la force motrice seule ne peut pas expliquer la variabilité de la modulation du potentiel de membrane décrite pendant les périodes de LIA.

Nous avons ensuite analysé les fluctuations du potentiel de membrane en mesurant sa variance pendant les rythmes theta et LIA. La variance du potentiel de membrane des cellules peut être considérée comme un proxy pour les changements d'activité synaptique, appelés également le bruit synaptique. Le terme bruit synaptique est généralement utilisé pour décrire les dynamiques sous le seuil de déclenchement des potentiel d'action du potentiel de membrane des neurones *in vivo*. Ces dynamiques sont causées par la décharge d'un nombre important de neurones présynaptiques. Au cours de nos expériences, la variance du potentiel de membrane des CP de CA3 était significativement plus importante pendant la LIA et plus faible pendant le theta, suggérant que le bruit synaptique augmente pendant la LIA et diminue pendant les périodes de theta. Cette relation ne semble pas dépendre de la direction de la modulation de la cellule (hyperpolarisation ou dépolarisation). Cette observation est intéressante car la variance du potentiel de membrane est généralement reliée à la valeur du potentiel de membrane. Ici, la variance du potentiel de membrane des CP était plus faible pendant les hyperpolarisations associées au rythme theta comparées à celles associées à la LIA. Cette même différence était observable lors des dépolarisations. Ces résultats suggèrent que la diminution de la variance du potentiel de membrane qui a lieu pendant le rythme theta n'est pas uniquement une conséquence du changement du potentiel de membrane, et qu'un mécanisme spécifique est présent pour maintenir la valeur de la variance du potentiel de membrane basse pendant les oscillations theta, indépendamment du potentiel de membrane. De manière similaire, les transitions à la LIA induisent une augmentation de la variance plus importante que celle qui devrait avoir lieu lors d'une simple dépolarisation.

Intracellular dynamics of CA3 pyramidal cells across brain states

Meryl Malezieux^{1,2*}, Ashley L. Kees^{1,2*} and Christophe Mulle^{1,2}

¹Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297

²University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

**equal contribution*

Abstract

During quiet wakefulness, the hippocampal local field potential (LFP) displays large irregular activity (LIA) punctuated by sharp-wave ripples, which play a role in memory consolidation, whereas during exploratory behaviors, hippocampal LFP oscillates at both theta and gamma frequencies. Monitoring the intracellular dynamics of individual neurons *in vivo* such as membrane potential, intrinsic excitability, and synaptic efficacy is essential to understand how single-cell properties contribute to network processing across these different brain states. We have explored the intracellular dynamics of pyramidal cells (PCs) in the area CA3 of the hippocampus in awake mice. CA3 is important for rapid encoding of memory and integrates multimodal information from the entorhinal cortex, dentate gyrus, and CA3 itself before output to CA1. We have used whole-cell patch-clamp recordings from CA3 PCs in awake head-fixed mice combined with measurements of pupil diameter, treadmill running speed and LFP recordings of oscillatory activity. Our findings show that a large proportion of CA3 PCs are prone to intracellular modulation during changes in brain states. During theta states, most CA3 PCs hyperpolarized, reduced their firing, and had lower Vm variance as compared to LIA states. These results demonstrate a specific role for CA3 PCs during theta as compared to CA1 and DG cells which do not show any intracellular modulation. During periods of hyper-arousal such as theta states, a small subpopulation of CA3 PCs is however selectively active while most CA3 PCs are silenced. This modulation at the single-cell level in CA3 could play a role in the emergence of oscillations, and underlie the ability of CA3 to perform different memory functions during different brain states.

Introduction

Wakefulness is comprised of distinct brain states, correlated with different behaviors and characterized by specific oscillatory patterns in the local field potential (LFP). The ability of brain circuits to generate distinct brain states and oscillations is thought to rely upon modulations in single-cell properties, such as resting membrane potential, spike threshold, and synaptic efficacy (Marder et al., 2014). Monitoring the membrane potential of individual neurons *in vivo* is hence essential to understand how single-cell properties contribute to network processing across different brain states.

The hippocampus plays a critical role in the encoding, consolidation, and retrieval of episodic memories which consist in a combination of both spatial and non-spatial information (Buzsáki and Moser, 2013, Eichenbaum, 2016). Oscillatory dynamics and the firing patterns of neural ensembles in the hippocampus support spatial coding as demonstrated by a large number of studies based on extracellular recordings in freely behaving animals (Buzsáki & Moser, 2013). During wakefulness, periods of locomotion are associated with robust theta (4–12 Hz) and gamma (30–80 Hz) oscillations in the LFP. During quiet wakefulness, the hippocampal LFP displays large irregular activity (LIA) punctuated by sharp-wave/ripples (SWRs). Individual sharp waves (500 ms in duration) often co-occur with ripple oscillations (80–250 Hz), which play a role in memory consolidation (Buzsáki, 2015). Since their discovery in the rabbit hippocampus, theta rhythms have been extensively studied (Jung and Kornemuller, 1938) and found in many species including rats, mice, monkeys and humans (Vanderwolf, 1969; Green and Arduini, 1954; Jutras et al., 2013; Ekstrom et al., 2005). They have been mostly studied in the hippocampus, in which they are observed during locomotion. The percentage of time in which theta is present in the LFP can predict the rate of acquisition and the quality of a memory, suggesting an important role for theta in the formation of memories (Landfield et al., 1970; Winson, 1978; Berry and Thompson, 1978). Additionally, theta correlates with movement associated with active sampling of the environment, like sniffing and whisking, and therefore appears well suited for the coordination of multimodal sensory integration (Macrides et al., 1982; Komisaruk, 1970). During non-locomotor behaviors, such as sitting quietly, eating, drinking, and grooming, as well as during slow wave sleep, LIA is present in the hippocampal LFP. The LIA pattern is marked by high-amplitude broadband fluctuations rather than oscillations at a specific frequency band, and is often characterized by the presence of SWRs (Vanderwolf, 1969; O'Keefe, 1976; Buzsáki, 1986). LIA is present during periods of low arousal, and is thought to represent a state in which memory consolidation and retrieval of episodic memory is promoted (Carr et al., 2011), especially during the SWRs, where cells replay their activity (Lee and Wilson 2002; Diba and Buzsáki 2007).

Intracellular activity from single CA1 pyramidal cells in awake behaving animals has provided unprecedented insight into the relationship between network and single-cell activity and its role in behavior and cognition. By combining intracellular and multisite extracellular recordings *in vivo* in head-fixed rodents the membrane potential dynamics and synaptic mechanisms of CA1 PCs was characterized during SWRs (English et al., 2014; Gan et al., 2017; Hulse et al., 2016; Maier et al., 2011) and in relation to brain state and arousal (Hulse, Lubenov, & Siapas, 2017). CA1 hippocampal place cells have been recorded intracellularly in both freely moving (Epsztein, Brecht, & Lee, 2011) and head-fixed (Bittner et al., 2015; Cohen, 2017; Harvey et al., 2009) rodents, enabling the direct measurement and manipulation

of inputs and cell-intrinsic properties during spatial exploration. Recordings of subthreshold events, such as plateau potentials and complex spikes, have led to the hypothesis that a nonlinear interaction between inputs from the entorhinal cortex (EC) and CA3 allows the CA1 circuit to associate contextual and spatial information (Bittner et al., 2015; Grienberger et al., 2014).

However, these types of studies have been mostly restricted to CA1, and very few studies have examined the intracellular activity of CA3 PCs *in vivo*. The membrane potential dynamics of CA3 PCs *in vivo* recorded with single-cell patch clamp techniques has only been characterized in anesthetized rats (Kowalski et al., 2016) or mice (Zucca et al., 2017). CA3, the main excitatory input to CA1, is unique in both its functional and anatomical characteristics. Computational theories have long proposed that CA3 rapidly stores memories through synaptic plasticity in the autoassociative network formed by its recurrent connections, and CA3 is indeed crucial to one-trial memory encoding (Kesner and Rolls, 2015). CA3 neurons are thought to integrate spatial and non-spatial information through anatomically organized inputs displaying striking anatomical and functional features (e.g. the autoassociative CA3 network, parallel direct vs. indirect cortical inputs and detonator properties of inputs from the dentate gyrus) (Rebola et al., 2017). Moreover, CA3 has been implicated in the generation of both gamma oscillations and SWRs, both important in memory encoding and consolidation (Csicsvari et al., 2000; Bazelot et al., 2016; Csicsvari et al., 2003; Hajos et al., 2004; Bazelot et al., 2010). Considering that specific brain states are supporting different memory stages, and the importance of CA3 circuit for rapid encoding and retrieval of episodic memories, we hypothesize that changes in intracellular properties of CA3 PCs may underlie the ability of CA3 to perform distinct memory functions. We have thus explored the modulation in the intracellular dynamics of CA3 pyramidal cells (PCs) during changes in brain state, by using whole-cell patch-clamp recordings from CA3 PCs in awake head-fixed mice, in combination with measurements of pupil diameter, treadmill running speed and LFP recordings of oscillatory activity.

Results

Hippocampal CA3 LFP characterization and brain state classification

To investigate the intracellular dynamics of CA3 PCs *in vivo*, we performed simultaneous whole-cell and local field potential (LFP) recordings in awake head-fixed mice free to run and rest on a wheel (Fig. 1A). An LFP electrode was first positioned in the *stratum pyramidale*. *Stratum pyramidale* of CA3 showed positive large sharp-wave ripples (SWRs) during periods of quiet wakefulness, and theta oscillations during locomotion. We then lowered the patch-clamp electrode for whole-cell recordings of a CA3 PC located in the vicinity of the LFP electrode. We aimed to position the tips of the LFP and patch electrodes within 200 μm of each other; electrode positions were confirmed post hoc by histology. Pyramidal cell identity was determined by the voltage response to current steps as well as by the presence of burst firing (Fig. 1B), and confirmed post hoc by the localization of biocytin in CA3. We measured locomotor activity on a running wheel and pupil diameter to monitor the level of arousal (Fig. 1 A, C). Figure 1C shows an example of a simultaneous current-clamp recording from a CA3 PC aligned with the LFP recording, the corresponding locomotor activity and the pupil diameter. We recorded a total of 35 CA3 PCs, and 5 dentate gyrus granule cells (GCs). In some cases, the patched cell was filled with biocytin and recovered in histology, confirming the cell identity (Fig. 1D). The basic properties of recorded CA3 PCs

and GCs are shown in Table 1. Brain state classification was achieved offline using the spectrogram of the LFP to find epochs of theta and LIA (Fig. 2A, B). Theta was detected using the ratio of power in the theta (6-9 Hz) range to power in the delta (0.5-3 Hz) range (Fig. 2B). From a total of 857 theta events, 58.5% occurred in conjunction with detected locomotory activity (run theta); the remaining 41.5% were categorized as rest theta. LIA was detected as peaks in the average broadband power (0.5-80 Hz) after z-scoring within frequency bands; events that overlapped with theta periods were not included (Fig. 2B). Theta and LIA events were dispersed throughout the session with no apparent pattern; an example session is shown in Fig. 2C. Over a total recording time of 270 minutes, 14.5% was classified as run theta, 6.3% as rest theta, and 9.9% as LIA, leaving 69.3% unlabeled (Fig. 2E). Out of the three event types, run theta occurred for the longest duration (Fig. 2D, $p < 0.001$ compared with rest theta and LIA). Both type of theta events also occurred significantly more often than LIA (Fig. 2D). The pupil diameter of the mice was smaller during LIA events as compared to theta (Fig. 2F), consistent with previous reports (Hulse et al., 2017), and confirming that arousal was higher during theta than LIA. Not surprisingly, the theta-delta ratio was higher during theta than LIA (Fig. 2G), but interestingly, was significantly higher during run theta than rest theta (Fig. 2G). For events of run theta, increases in the theta-delta ratio often preceded the start of the detected run (Fig. 2H). This is in accordance with previous studies, which have shown that several hundred milliseconds before rodents engage in locomotion, a theta frequency band emerges in the hippocampal field potential (Vanderwolf, 1969; Green and Arduini, 1954; Fuhrmann et al., 2015). Thus, the LFP in the CA3 PC layer displays many of the same brain state modulations as previously reported in CA1.

Table 1. Properties of recorded CA3 PCs and DG GCs

	Ra (M Ω)	Rin (M Ω)	Vm (mV)	AP threshold
CA3 PCs (n=35)	52.37 ($\pm$ 2.55)	147.32 ($\pm$ 15.19)	-59.24 ($\pm$ 2.14)	-33.22 ($\pm$ 1.31)
GCs (n=5)	79.99 ($\pm$ 13.8)	190.15 ($\pm$ 40.66)	-65.35 ($\pm$ 3.21)	-31.28 ($\pm$ 2.92)

CA3 PCs hyperpolarize and decrease their firing during theta events

We explored the intracellular properties of CA3 PCs during theta. Spatial and episodic memory encoding is thought to happen preferably during theta. We thus hypothesized that during this state, the properties of CA3 PCs would change in order to optimize the integration of incoming sensory input from the DG and EC. To study the intracellular modulation of CA3 PCs during theta oscillations, we analyzed the change in Vm and firing rates occurring at the onset of theta events (Fig. 3). We observed that Vm decreases at the onset of the theta events in a large proportion of events (Fig. 3A). On average, the membrane potential of CA3 PCs hyperpolarized during theta (Fig. 3B). However individual theta events could be accompanied by hyperpolarization, depolarization, or with no change in Vm (Fig. 3B). Out of 857 theta events, 45.7% were associated with a significant hyperpolarization, 25.9% with depolarization and 28.3% showed no significant modulation (Fig 3C). Compared with randomly-selected times, there was a significantly higher proportion of hyperpolarizing events and significantly lower proportion of depolarizing and nonsignificant events, suggesting not only that the Vm tends to change at the onset of theta, but that

this change tends to be a hyperpolarization. Theta can occur in the presence or absence of running, so we next asked whether this made a difference in the observed changes in Vm. No difference in the proportion of Vm changes was observed between run theta and rest theta events, suggesting that the relationship between theta and Vm does not depend on the running behavior, but is more closely related to the internal brain state (Fig 3D). Next, we observed that while many cells consistently hyperpolarized during theta events, a few cells consistently depolarized, and several cells sometimes switched from hyperpolarization to depolarization in consecutive theta events. To classify the cells according to the direction of the change in Vm, we shuffled the data for each cell by shifting the time relationship between Vm and theta events; cells that showed a larger positive or negative average change in Vm than was observed in the shuffled data were considered significantly depolarizing or hyperpolarizing, respectively. By this measure, 16 cells were significantly hyperpolarizing during theta, 3 were significantly depolarizing, and 16 showed no difference with the shuffled data set, perhaps due to a variable change in Vm at the onset of theta events (Fig. 3E). Hyperpolarization during theta was accompanied with a decrease in firing rate, and the opposite was true for the depolarizing events (Fig. 3F). These results indicate that during theta, cells showing a modulation of their membrane potential tend to hyperpolarize and decrease their firing whereas a small fraction depolarize and increase their firing. Furthermore, this shows that the theta-associated changes in Vm have ramifications downstream via the output of the cell.

CA3 PCs tend to depolarize and increase their firing during LIA events

We performed similar analysis looking at LIA during quiet wakefulness (Fig. 4A), a brain state characterized by the presence of SWRs, which have been shown to play a role in memory consolidation. We hypothesized that in this state, the properties of CA3 PCs should favor integration of recurrent inputs from other CA3 PCs. Indeed, during LIA events, the membrane potential of CA3 PCs tended to depolarize, suggesting that they entered a more excitable state, possibly supporting the generation of SWRs (Fig. 4B). However, as with theta events, the response was heterogeneous, with some LIA events coinciding with a depolarization, hyperpolarization, or no significant change in the Vm (Fig. 4B). Out of 433 LIA events, 44.1% were associated with a depolarization (significantly more often than randomly-selected times, $p < 0.001$), 19.2% with a hyperpolarization (significantly less often than randomly-selected times, $p < 0.001$), and 36.7% with no change in the Vm (not different from randomly-selected times, $p = 0.734$) (Fig. 4C). However, compared with a shuffled data set, only 8 cells depolarized significantly, 2 cells hyperpolarized and 24 cells showed no modulation (Fig. 4D). Cells that depolarized during LIA also tended to increase their firing rate (Fig. 4E). Of the 8 LIA-depolarizing cells, 7 were also theta-hyperpolarizing, suggesting that this is a common combination of responses. Interestingly, there did not seem to be a corresponding overlap between LIA-hyperpolarizing and theta-depolarizing cells; rather, these cells also hyperpolarized during theta events (Fig. 4F). From this, we interpret that the cells that are modulated during LIA- tend to hyperpolarize during theta. These modulations have a direct impact on their spiking activity and likely influence the general CA3 network to favor efficient encoding of information during theta, and generation of SWRs for consolidation during LIA.

Pupil diameter fluctuations correlate with general brain states but not with direction of intracellular Vm modulation in CA3 PCs

Rapid variations in cortical state during wakefulness are tightly correlated with changes in pupil size across species (McGinley et al., 2015, Reimer et al., 2014). In agreement with previous studies, during theta recorded in CA3, the pupil was dilated (Fig 5A, B). The pupil dilated at the onset of theta, and remained dilated until the end of the theta event. Inversely, during LIA, pupil was constricted (Fig 5A, B). In addition to being tightly correlated with brain state, the pupil diameter is also correlated with the membrane potential of a variety of cell types (Reimer et al., 2014). Thus, we asked whether variations in pupil diameter could explain the variation in the change in membrane potential we saw in CA3 PCs. However, this was not the case; during theta events, the level of pupil dilation did not depend on whether the event was associated with a hyperpolarization or a depolarization of the Vm of CA3 PCs (Fig. 5C). Conversely, the level of pupil constriction did not depend on the direction of Vm modulation of CA3 PCs during LIA events (Fig. 5C). Hence, although pupil diameter is tightly correlated with the global brain states, it does not help predict the direction of single-cell modulation of Vm seen during those states. There might be discrete pupil diameter changes inside a defined brain state that would correlate with specific changes in Vm of CA3 PCs. Indeed, in DG and CA1, it has been shown that fluctuations in pupil diameter within LIA events are reflected in the subthreshold dynamics of individual neurons (Hulse et al., 2017). However, considering the infrequent occurrence of discrete dilations within LIA events of constricted pupil diameter, we could not perform a similar analysis in the present study.

Possible mechanisms of intracellular modulation in CA3 PCs during different brain states

We next attempted to provide a mechanistic explanation for the modulation of Vm observed during theta and LIA events. We first examined the correlation between the change in Vm and the initial Vm value before the state transition (Fig. 6A, B). To exclude the possibility of the Vm being influenced by the holding current imposed on the cell membrane, we restricted this analysis to events when less than 10 pA were being injected through the patch pipette. During theta events, the more depolarized the CA3 PC was initially, the larger was the hyperpolarization (Fig. 6A). The correlation between initial Vm and change in Vm was significant for theta events, suggesting that the direction of the modulation during theta depends on changes in driving force due to different initial resting membrane potentials (Fig. 6A). To validate this hypothesis, we injected current into the cells through the patch pipette to impose a lower initial Vm and thus attempt to reverse the driving force. Surprisingly, this manipulation did not increase the proportion of depolarizing events, but rather led to an insignificant increase in the proportion of hyperpolarizing theta events (Fig. 6A). This may in part be due to the difficulty in controlling the resting membrane potentials of cells *in vivo*, and of remote compartments in particular. Another possible explanation is that the changes occurring during theta are more complex than just a change in the conductance of a single ion species. In contrast, during LIA, the change in membrane potential was only slightly correlated with the initial Vm value (Fig. 6B), suggesting that the driving force alone cannot account for the variability in Vm modulation seen during LIA. Unsurprisingly, manipulations of the membrane potential with current injections did not significantly alter the proportion of hyperpolarizing and depolarizing events associated with LIA (Fig. 6B). To further test whether the Vm changes were due to ion channel modulation, we measured the input resistance in 13 cells during theta

and LIA. To do this, we injected short (100 ms) hyperpolarizing (-100 pA) current steps and measured the voltage response during different states. When compared with all other times, the modulation of membrane potential during theta and LIA was not accompanied by a significant change in input resistance. However, when we directly compared the input resistance measurements taken during theta and LIA, 6 out of 13 cells showed a significantly higher input resistance during LIA (Fig. 6C). A difference in input resistance between the two brain states could reflect different intracellular states for synaptic integration and spiking output.

As a proxy for changes in synaptic activity (also called synaptic noise), we analyzed the membrane potential fluctuations by measuring the variance of the Vm during LIA and theta (Fig. 7). The term synaptic noise is commonly used to describe the irregular subthreshold dynamics of the membrane potentials of neurons *in vivo*, which are caused by the discharge of a large number of presynaptic neurons. Figure 7A shows an example of the membrane potential of a cell after spike removal (black) and smoothing (grey). The variance was calculated over 1-second windows of the residual trace, which is the difference between the original and smoothed Vm traces. In comparison to all other times, variance was significantly higher during LIA and significantly lower during theta (Fig. 7B), suggesting that synaptic noise increases during LIA and decreases during theta. This relationship does not seem to depend on whether the cells hyperpolarize or depolarize; that is, theta-depolarizing cells also have reduced variance during theta, and LIA-hyperpolarizing cells have increased variance during LIA. This is interesting because the variance tends to be closely related to the average Vm (Fig 7C). This led us to ask whether the brain state can influence the normal relationship between Vm and variance. To do this analysis, we started by identifying all of the significant hyperpolarizing and depolarizing events, and then separating them based on whether they coincided with the onset of a theta or LIA event. Out of 1948 hyperpolarizing events, 421 coincided with theta, and 101 with LIA. Out of 2058 depolarizing events, 219 coincided with theta, and 208 with LIA. The average Vm and variance for all hyperpolarizations and depolarizations are shown in Fig 7D and E, respectively. For each hyperpolarization or depolarization, the final membrane potential and variance was taken at the end of the change. The variance was lower after hyperpolarizations than after depolarizations, as could be expected by the relationship between Vm and variance. However, variance was lower during theta-associated than LIA-associated hyperpolarizations (Fig. 7D), and the same was true of depolarizations (Fig. 7E). This relationship held true in spite of a lack of difference between the absolute membrane potential of theta- and LIA- associated changes in Vm (Fig. 7D). Taken together, these results suggest that the reduction in variance that occurs during theta is not merely a byproduct of the change in Vm and that a specific mechanism is taking place to keep the variance of the cell low during theta oscillations, independently of the Vm modulation. Similarly, LIA induces an increase in variance in addition to what would normally occur with a depolarization.

Discussion

Modulations in single-cell properties, such as resting membrane potential, intrinsic excitability and synaptic activity are thought to underlie the ability of brain circuits to generate the activity patterns that correlate with distinct brain states (Marder et al., 2014). Addressing these single-cell properties requires the simultaneous recording of extracellular ensemble activity and intracellular membrane potential in

awake animals. We have found that in head-fixed awake mice, CA3 PCs generally hyperpolarize and have smaller amplitude membrane fluctuations during theta, leading to decreased spiking activity. Locomotion on a treadmill occurs shortly following the onset of theta, and consequently is also associated with hyperpolarization and decreased variance. However, these features were also observed in theta events not associated with locomotor activity. The amplitude of the hyperpolarization increased when the cell membrane was initially more depolarized, consistent with an increase in the driving force. Conversely, during periods of quiet wakefulness characterized by LIA periods, the membrane potential of a number of CA3 PCs tends to depolarize, leading to increase spiking activity, and shows higher variance. Almost all cells modulated during LIA are modulated during theta, which may represent a population of CA3 PCs prone to brain state modulation.

In the neocortex, recordings of single cell Vm dynamics across brain states and during behavior have been key in elucidating the cellular mechanisms underlying the occurrence of distinct network activity patterns (Polack et al., 2013; Schneider et al., 2014; Crochet and Petersen, 2006). In the hippocampus, modulation of the activity of neural ensembles and network oscillations has been extensively studied in awake behaving rodents, in particular in reference to spatial information processing (Buzsáki and Moser, 2013). Relatively less is known on the intracellular mechanisms underlying the emergence of network activity patterns in the awake animal performing a behavioral task or across brain states in this brain area. A detailed analysis of Vm fluctuations in CA1 PCs and in DG cells during LIA, SIA and theta events in head-fixed awake mice was recently described (Hulse et al., 2017). Across the transition to LIA, most cells in both CA1 and DG depolarized and their Vm demonstrated increased variability. We observed similar features for CA3 PCs albeit the depolarizing events were present in only a subpopulation of CA3 PCs whereas a majority of CA3 PCs did not demonstrate any significant change in membrane potential. Therefore, we propose that LIA is a common hippocampal regime, with the principal cells of every sub-region entering a more excitable state. We hypothesize that this state is consistent with a transfer of information along the hippocampal trisynaptic pathway, possibly due to a propensity to generate and transfer SWRs which are important for memory consolidation (Buzsáki, 2015; Foster and Wilson, 2006). It should be noted however, that among the cells that did not show a clear hyperpolarizing or depolarizing modulation during LIA, there seem to be cells that displayed a mixed behavior of occasional hyperpolarization or depolarization during different LIA events. Further work is needed to be able to statistically separate this cell population from cells which truly do not show any intracellular modulation.

During theta states, CA3 PCs mostly hyperpolarized, reduced their firing, and had lower Vm variance. A striking property of this state was that the single-cell modulation of CA3 PCs did not seem to differ depending on the detection of locomotor activity, suggesting that Vm and Vm variability reliably report transition between brain states regardless of the behavioral output; we cannot exclude, however, undetected fine movements such as whisking activity. We also observed that almost all CA3 PCs that showed modulation during transition to LIA also showed hyperpolarization during transition to theta, suggesting that a subpopulation of CA3 PCs is prone to closely reflect fluctuations in brain states.

In a previous report, it was shown that while transitions to theta were similarly accompanied with increased locomotor activity and pupil dilation, no significant change was observed in membrane potential or Vm variability in CA1 or DG cells (Hulse et al., 2017). Therefore, theta seems to influence

specifically CA3 PCs, which decrease their Vm, Vm variability and firing rate during theta. This suggests local control of the hippocampal subregions by distinct neuromodulatory mechanisms or by local regulation of the inhibition/excitation balance. Moreover, it should be noted that we also recorded from 3 significantly depolarizing CA3 PCs during theta. These cells also showed an increased firing rate. Spatial and episodic memory encoding is thought to happen during theta, so it is expected that some CA3 PCs are active during this state, to encode incoming information and transfer it to the downstream CA1. The fact that most CA3 PCs hyperpolarize during theta, whereas a subpopulation depolarize, may indicate a mechanism by which CA3 PCs pertinent to a given sensory or behavioral situation are selected, while keeping the other cells silent and reducing synaptic noise in the CA3 circuit. It would be interesting to investigate whether these different populations correspond to morphologically distinct categories of CA3 cells (Sun et al., 2017; Hunt et al., 2018). Whether these membrane potential modulations indicate a special role of CA3 in the hippocampal circuit remains to be seen, but the heterogeneity within CA3 cells and the apparent difference with DG and CA1 cells provides an interesting constraint to the computational theories of the region. In neocortical neurons, membrane potential and variability are proposed to exhibit a U-shaped dependence on arousal, as indexed by pupil diameter; stable hyperpolarization occurs at intermediate arousal, and depolarization occurs during phasic or tonic periods of hyper-arousal, which include periods of locomotion (McGinley et al., 2015). Although pupil dilation correlates well with the general brain state as indexed by LFP recordings in CA3, pupil diameter does not consistently predict the direction of Vm fluctuations in CA3 PCs during transitions to specific LIA or theta events. To be able to fit our data with a model for arousal (U-shaped, binary or sigmoid) we would need to analyze intracellular modulation of CA3 PCs during an intermediate level of arousal. Indeed, LIA is present during periods of low arousal, whereas theta is correlated with high arousal state. One intermediate state that is present in the hippocampus is during small irregular activity (SIA; Jarosiewicz and Skaggs, 2004). SIA is present in the hippocampus of rats during transitions in alertness where no locomotor movements are made, such as as abrupt halt from voluntary movement (Whishaw and Vanderwolf, 1971). Unlike LIA, when replay occurs, SIA has been shown to be the brain state in which hippocampal cells code for position during immobility (Jarosiewicz et al., 2002; Kay et al., 2016). However, PCs in CA3 have failed at showing any position coding during sleep or immobility (Kay et al., 2016), unlike CA1 and CA2 PCs. This suggests that SIA in CA3 might have a specific role and impact on CA3 PCs. In our experiments, we have so far failed to confidently detect SIA events. This might be inherent to our experimental configuration, where we are recording the LFP only at the tip of a glass pipette, which makes the analysis of the signal more difficult than when recorded with a multi-site electrode where the simultaneous LFP can be extracted from different channels. Another possibility is that in CA3, SIA is occurring less frequently or has different properties than in other part of the hippocampus, making it necessary to optimize the detection by other methods than previously reported.

Membrane hyperpolarization during transition to theta may potentially be explained by either an increase in inhibitory synaptic inputs and decreased excitatory drive, by the modulation of intrinsic properties in relation to the opening/closing of ion channels, or more likely by a combination of both parameters. The reduction in Vm variance would be consistent with a decrease in synaptic noise, although it is at present difficult to predict whether this corresponds to changes in either excitatory or inhibitory conductances. Increased synaptic input from GABAergic interneurons would favor

hyperpolarization, with an initial increase in synaptic noise followed by a decrease when the cell membrane gets closer to the reversal membrane potential for Cl^- . A decreased excitatory drive is expected as a consequence of reduced activity of CA3 PCs during transition to theta, hence reduction in recurrent CA3 network activity, but may not be causal to the initial hyperpolarizing events. Future analysis is required to extract this information from single membrane recordings (Pospischil et al., 2009; Bedard et al., 2012). We examined the modulation in input resistance in CA3 PCs across changes in brain states, which could be indicative of changes in intrinsic excitability. In a general analysis, transition to either theta or LIA was not accompanied by a significant modulation of input resistance. Likely, our evaluation of changes in intrinsic excitability is too coarse to provide a reliable indication overall. However, when directly comparing input resistance during LIA and theta within single cells, we observed that LIA correlates with a higher input resistance than theta. Neuromodulatory inputs correlated with changes in brain states, such as acetylcholine, serotonin or noradrenaline, may underlie both changes in intrinsic excitability and activity of presynaptic neurons (e.g. GABAergic interneurons) (Polack et al., 2013). Future studies should address whether any of these modulatory systems accompany transition to either theta or LIA by using a local pharmacological approach, which could in turn provide insight into the cellular mechanisms explaining the change in membrane potential and Vm variability.

Fast transitions across brain states in the hippocampus are reflected by coordinated changes in subthreshold intracellular dynamics of CA3 PCs. The membrane potential and variance of Vm in CA3 PCs correlate with transitions to LIA and theta. These results demonstrate a specific role for CA3 PCs during theta as compared to CA1 and DG cells (Hulse et al., 2017) as well as neocortical neurons (McGinley et al., 2015). During this period of hyper-arousal, a small subpopulation of CA3 PCs are selectively active while most CA3 PCs are silenced. The dynamics of CA3 PCs across the different states could contribute to the emergence of selected neural ensembles during active periods which allows the storage of multimodal information. In contrast, during LIA, principal cells from DG, CA3, and CA1 enter a depolarized state, possibly enhancing the ability to produce SWRs and transfer information between regions during memory consolidation.

Experimental procedures

All experiments were approved by the Ethical Committee #50 and the French Ministry for Education and Research.

Animals

C57Bl6/j male mice were obtained from Charles River and used according to the regulations of the University of Bordeaux/CNRS Animal Care and Use Committee. Animals were housed with their littermates 3 per cages with *ad libitum* access to food and water. Cages were kept in a temperature-regulated room on a 12 h light/dark cycle. All experiments were performed in the light phase in P21-to-P69 mice. Electrophysiological recordings were performed on P45-to-P71 mice.

Surgery

Headbar implantation

Custom-made stainless steel head bars (35x3x3 mm) were affixed to the skulls of 4-to-5-week-old mice using Superbond (Phymep) and dental acrylic (Dentalon, Phymep) while under isoflurane anesthesia. The skull underneath the head implant opening was covered with superbond and future locations for the craniotomies above CA3 were marked using stereotactic coordinates (2.0 caudal, 2.0 lateral from bregma).

Craniotomy

The day of recording, animals were anesthetized using isoflurane and a craniotomy (approximately 1.5 mm diameter) was drilled at previously marked location. The dura was left intact and craniotomy was covered with silicone elastomer (Kwik-cast, World Precision Instruments). Mice were placed in a recovery cage for at least 1.5 hours before recording. Mice were typically kept for two consecutive days for recordings. At the end of the 1st recording day, the craniotomy was cleaned using standard Ringer's solution and protected with silicone elastomer again, and mice returned in their homecage until the next day.

Training

After headbar implantation, mice were left 2-3 days for recovery, until they started to gain weight again. The first day of training consisted in leaving the animals exploring freely the wheel for 15 min without being headfixed. During the following 4 days, mice were progressively headfixed for 10 min on day 1, 30 min on day 2, 60 min on day 3 and 120 min on day 4. Mice were then headfixed 120 min each day until they habituated and were alternating between running and stopping without showing sign of excessive stress (freezing, escape attempts, struggling, excessive excretion, vocalization). Typically, mice habituated in 2-to-10 days. During the 2 last training days, mice were headfixed on the principal wheel used for the recordings and habituated to the ambient light and noises occurring during a typical experiment.

Recordings

Whole-cell recordings

For each animal before whole cell patching, the depth of the pyramidal cell layer was detected using an extracellular recording. Extracellular electrodes were glass patch electrodes (World Precision Instruments) prepared with a vertical puller PC-10 (Narishige) and then broken so that the resistance when filled with standard Ringer's solution (in mM : 135 NaCl, 5.4 KCl, 5 HEPES, 1.8 CaCl₂, and 1 MgCl₂) was 0.8–1.5 MΩ. The extracellular electrode used to determine the pyramidal cell depth for whole-cell recording was mounted vertically on a micromanipulator (Scientifica). As the electrode was advanced through the cortex, the CA1 pyramidal cell layer was identified when multi unit activity could be detected and the amplitude of ripples increased, typically 1.3–1.5 mm below the surface of the brain. The polarity of the ripples inversed below the CA1 pyramidal layer, and the electrode was advanced further down the hippocampus until the ripples changed polarity again (to positive) and multi-unit activity was detected, indicative of the CA3 pyramidal layer. The extracellular electrode to be used for LFP recordings during whole cell patching was mounted to a second micromanipulator (Luigs and Neumann) on a 22.5° angle relative to the vertical axis, and advanced through the same craniotomy at a more medial and caudal position. This extracellular electrode was advanced until detection of the pyramidal cell layer but not through it. The two LFPs were recorded for further analysis of high correlation between the two signals (phase of theta, coincidence of ripples, multi-unit activity), indicative of a short distance between the two recording sites. Whole-cell patch electrodes (3.5-5 MΩ) were prepared before the beginning of electrophysiology experiments, and were filled with a solution containing (in mM) 120 K-methanesulfonate, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, and 2 Na-ATP, at 290–300 mOsm and pH 7.2–7.3 adjusted with KOH. Whole-cell patch electrodes were advanced through the cortex with 200-300 mbar of pressure to prevent the electrode tip from clogging. Approximately 100 μm from depth measured using the extracellular electrode, the pressure was reduced to 100 mbar. Few μm above the cell layer depth measured using the extracellular electrode, the pressure was reduced to 20 mbar (search mode). Cells were identified by reproducible increases in electrode resistance. Whole-cell patch-clamp recordings were achieved using a standard blind-patch approach as previously described (Margrie et al., 2002; Lee et al., 2009). The intracellular solution was supplemented with 0.2% (w/v) biocytin for post hoc cellular identification and morphological reconstruction. Access resistance and membrane capacitance of the cells were monitored on-line with the membrane test feature of the acquisition software and analyzed off-line. The mean access resistance was 52,4 ± 2,5 MΩ. The membrane potential was not corrected for the liquid junction potential. Recordings were discarded when the access resistance exceeded 100 MΩ or the action potential peak dropped below 0 mV.

Data acquisition

Electrophysiology

All recordings were made in the current-clamp configuration. Recordings were obtained with a Multiclamp 700B amplifier connected to the Digidata 1440A system. Data were acquired with pClamp 10

(Molecular Devices), digitized at 10 kHz, filtered at 3 kHz, and analyzed off-line with Clampfit 10.4 (Molecular Devices) and Python.

Pupil recording

Pupil diameter data came from a subset of recordings (n=11/30). To measure pupil diameter, the mouse was illuminated with an infrared (850 nm) battery operated light (Maketheone IR Torch 850NM) and imaged with a camera (DALSA GENIE NANO-M1280-NIR) at 10 Hz.

Locomotion

Online running behavior was recorded using Poly Wheel software (Imetronic, France) and acquired at 32Hz. Locomotion start was detected as IR sensor crossing by the animal. 16 sensors were located on a wheel of 20 cm diameter. Extraction of the animal's velocity during the recording session was done using Poly Wheel software.

Histology

To recover the morphology of neurons filled with biocytin during *in vivo* whole-cell patch-clamp recordings, brains were removed after the completion of electrophysiology experiments and were fixed for 1 week at 4°C in a solution containing 4% PFA in 1X PBS, pH7.4. Coronal slices (100 μ m thick) were washed three times with 0.3% Triton X-100 in 1X PBS (20 min each) and incubated overnight at 4°C in 1:1000 Alexa Fluor 488 conjugated in the same solution. In between all experimental procedures, slices were washed with 1X PBS. Images were acquired using a confocal microscope (TCS SP8, Leica) and oil objective HC PL APO 40x/1.30.

Analysis

Membrane potential

Analysis looking at changes in Vm was performed on a spike-removed Vm trace. Spikes were detected when the derivative of the Vm (dV/dt) exceeded 5 mV/ms. To keep a conservative estimate of average Vm, spikes and their underlying depolarizations such as plateau potentials were removed. The spike-removed Vm trace was then smoothed by taking the mean over a sliding window of 2 s, and the smoothed Vm was downsampled to 20 Hz. The residual Vm trace was obtained by subtracting the smoothed Vm from the spike-removed Vm. From this residual Vm, the variance was calculated over a sliding a window of 1 s. The variance trace was then smoothed by taking the mean over a sliding window of 2 s and downsampled to 20 Hz.

LFP

LFP signal was downsampled 10 times to 2000 Hz and filtered using a 4-pole butterworth band-pass filter between 0.2 Hz and 100 Hz. After filtering, LFP was again downsampled to 200 Hz. The spectrogram of the LFP was calculated using consecutive fast Fourier transforms within ~2 second boxcar windows with

90% overlap. Theta (6-9 Hz), delta (0.5-3.5 Hz) and gamma (30-50 Hz) powers were extracted from the spectrogram. Then theta/delta powers and LFP power between 0.5 Hz and 80 Hz were z-scored.

Brain state classification

Start of theta events were classified as positive theta/delta powers. To be counted as theta events, theta bouts had to be longer than 1 s and have a power higher than 1 sd above the mean at least once. If too theta bouts were happening less than 1 s apart, they were merged into one single theta period. Start of LIA events were classified as LFP power above the mean (between 0.5 Hz and 80 Hz). To be counted as LIA events, LIA bouts had to be longer than 2 s and have a power higher than 0.25 sd above the mean at least once. If too LIA bouts were happening less than 0.5 s apart, they were merged into one single LIA period.

Pupil diameter

To measure pupil diameter, frames were extracted from the video file. Frames were converted from Red Green Blue color space to L*a*b color space (lightness (L) and two color channels (a and b)) for sharpening images and removing artifacts. To improve contrast, a Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) was applied to the L channel. Afterwards, a Circle Hough Transform (CHT) was performed to detect circular objects in the image, therefore the pupil. Radii of the detected circles were extracted automatically. Pupil diameter data was included after control of correct pupil detection. The resulting pupil diameter trace was smoothed with a 4-pole butterworth low-pass filter (0.5 Hz cutoff). Dilation events corresponded to pupil diameter higher than the mean pupil diameter during the session. To be counted as dilation events, dilations bouts had to be longer than 1 s. If too dilation events were happening less than 1 s apart, they were merged into one single dilation period.

Statistics

Unless otherwise noted, data were expressed as the median +/- the mean absolute derivation about the median, which was calculated by subtracting each data point from the group's median, taking the absolute value, summing, and then dividing by the number of data points. These measures of central tendency and variation were used because many distributions were found to be not normal. When comparing 2 groups, a bootstrapping method was used. Briefly, data from both groups were randomly resampled with replacement to form two surrogate groups. This was repeated 1,000 times, and if the difference in medians was more extreme than 95% of the surrogate trials, the groups were considered significantly different. For comparisons of 3 or more groups, a Kruskal-Wallis test was performed to determine the presence of any significantly different group before performing the 2-group bootstrap for each group pair. A different bootstrap test was used when comparing two non-independent groups. In this test, the difference between paired data points was randomly determined to be either positive or negative 1,000 times. If the mean of the differences in the actual data set was more extreme than 95% of those in the shuffled data set, the paired groups were considered to have a significant difference. For comparative scatter plots where variables during different states were compared, a Mann-Whitney U

test was used to determine whether there was a significant difference between the states for that particular cell (filled circles in scatter plots). When determining whether a value was significantly different from zero, a bootstrapping method was used. The distribution was demeaned and then resampled with replacement 10,000 times. If the mean of the original data was more extreme than 95% of the resampled means, it was considered significantly different from zero.

To determine whether a particular event was associated with a significant change in Vm, 2 two-second windows of the 20 Hz downsampled Vm around the start of the event were compared with a Welch's t-test. For theta, the comparison was made between -2.5 to -0.5 and 0.5 to 2.5 seconds with respect to the start of the event; for LIA, the windows were -4 to -2 and -1 to 1 seconds. Events with p-values less than 0.05 were considered to be hyper- or depolarizing depending on the direction of the change in Vm. To determine whether the proportions of hyperpolarizing, depolarizing and no change events could be due to chance, a bootstrapping method was used. For every recording, the actual event times were replaced with randomly-sampled times, and the same method as previously described was used to determine whether each random timepoint was associated with a hyperpolarization, depolarization, or no change. This was repeated 1,000 times to create a distribution of proportions. Proportions were considered significantly different from chance if they were either greater or smaller than 95% of the randomly-sampled data sets.

To determine whether a cell was consistently changed Vm at the start of a particular type of event, we used a bootstrapping method. Over a single recording session, the Vm and actual event times were shifted in time with respect to one another 6,000 times in increments of 50 ms. For each shift, the average change in Vm associated with event onset was calculated for the cell. Cells were considered significantly hyper- or depolarizing when the average change in Vm was more extreme than 95% of the shuffled data.

Acknowledgements

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the European Commission (EIF Fellowship awarded to AK), the ANR (grant Hippencode), and the Fondation pour la Recherche Médicale (to MM). We are grateful to Ania Gonçalves for help in confocal imaging and Mario Carta for fruitful discussions.

References

- Bazelot, M., Dinocourt, C., Cohen, I., & Miles, R. (2010). Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 588(12), 2077–2090.
- Bazelot, M., Teleńczuk, M. T., & Miles, R. (2016). Single CA3 pyramidal cells trigger sharp waves in vitro by exciting interneurons. *Journal of Physiology*, 594(10), 2565–2577.
- Bedard, C., Béhuret, S., Deleuze, C., Bal, T., & Destexhe, A. (2012). Oversampling method to extract excitatory and inhibitory conductances from single-trial membrane potential recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, 210(1), 3–14.
- Berry, S. D., & Thompson, R. F. (1978). Prediction of learning rate from the hippocampal electroencephalogram. *Science (New York, N.Y.)*, 200(4347), 1298–300.
- Bittner, K. C., Grienberger, C., Vaidya, S. P., Milstein, A. D., Macklin, J. J., Suh, J., ... Magee, J. C. (2015). Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1133–42.
- Buzsáki, G. (1986). Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Research*, 398(2), 242–252.
- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10), 1073–1188.
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130–138.
- Carr, M. F., Jadhav, S. P., & Frank, L. M. (2011). Hippocampal replay in the awake state: A potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature Neuroscience*, 14(2), 147–153.
- Cohen, J. D., Bolstad, M., & Lee, A. K. (2017). Experience-dependent shaping of hippocampal CA1 intracellular activity in novel and familiar environments, 1–27.
- Crochet, S., & Petersen, C. C. H. (2006). Correlating whisker behavior with membrane potential in barrel cortex of awake mice. *Nature Neuroscience*, 9(5), 608–610.

- Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, a, & Buzsáki, G. (2000). Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron*, 28(2), 585–594.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D., & Buzsáki, G. (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, 37(2), 311–322.
- Diba, K., & Buzsáki, G. (2007). Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nature Neuroscience*, 10(10), 1241–1242.
- Eichenbaum, H. (2016). Still searching for the engram. *Learning and Behavior*, 44(3), 209–222.
- Ekstrom, A. D., Caplan, J. B., Ho, E., Shattuck, K., Fried, I., & Kahana, M. J. (2005). Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus*, 15(7), 881–889.
- English, D. F., Peyrache, A., Stark, E., Roux, L., Vallentin, D., Long, M. A., ... Buzsáki, G. (2014). Excitation and Inhibition Compete to Control Spiking during Hippocampal Ripples: Intracellular Study in Behaving Mice. *J Neurosci*, 34(49), 16509–16517.
- Epsztein, J., Brecht, M., & Lee, A. K. (2011). Intracellular Determinants of Hippocampal CA1 Place and Silent Cell Activity in a Novel Environment. *Neuron*, 70(1), 109–120.
- Foster, D. J., & Wilson, M. A. (2006). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, 440(7084), 680–683.
- Fuhrmann, F., Justus, D., Sosulina, L., Kaneko, H., Beutel, T., Friedrichs, D., ... Remy, S. (2015). Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron*, 86(5), 1253–1264.
- Gan, J., Weng, S., Pernía-Andrade, A. J., Csicsvari, J., & Jonas, P. (2017). Phase-Locked Inhibition, but Not Excitation, Underlies Hippocampal Ripple Oscillations in Awake Mice In Vivo. *Neuron*, 93, 1–7.
- Green, J. D., & Arduini, A. A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *Journal of Neurophysiology*, 17(6), 533–57.
- Grienberger, C., Chen, X., & Konnerth, a. (2014). NMDA Receptor-Dependent Multidendrite Ca Spikes Required for Hippocampal Burst Firing In Vivo. *Neuron*, 81(6), 1274–81.
- Hajos, N., Palhalmi, J., Mann, E. O., Németh, B., Paulsen, O., & Freund, T. F. (2004). Spike Timing of Distinct Types of GABAergic Interneuron during Hippocampal Gamma Oscillations In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 9127–9137.
- Harvey, C. D., Collman, F., Dombeck, D. A., & Tank, D. W. (2009). Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature*, 461(7266), 941–946.
- Hulse, B. K., Lubenov, E. V., & Siapas, A. G. (2017). Brain State Dependence of Hippocampal Subthreshold Activity in Awake Mice. *Cell Reports*, 18(1), 136–147.

- Hulse, B. K., Moreaux, L. C., Lubenov, E. V., Siapas Correspondence, A. G., & Siapas, A. G. (2016). Membrane Potential Dynamics of CA1 Pyramidal Neurons during Hippocampal Ripples in Awake Mice. *Neuron*, 89(4), 800–813.
- Hunt, D. L., Linaro, D., Si, B., Romani, S., & Spruston, N. (2018). A novel pyramidal cell type promotes sharp-wave synchronization in the hippocampus. *Nature Neuroscience*.
- Jarosiewicz, B., & Skaggs, W. E. (2004). Level of Arousal During the Small Irregular Activity State in the Rat Hippocampal EEG. *Journal of Neurophysiology*, 91(6), 2649–2657.
- Jarosiewicz, B., McNaughton, B. L., & Skaggs, W. E. (2002). Hippocampal population activity during the small-amplitude irregular activity state in the rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(4), 1373–1384.
- Jung, R., & Kornmüller, A. E. (1938). Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 109(1), 1–30.
- Jutras, M. J., Fries, P., & Buffalo, E. A. (2013). Oscillatory activity in the monkey hippocampus during visual exploration and memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13144–9.
- Kay, K., Sosa, M., Chung, J. E., Karlsson, M. P., Larkin, M. C., & Frank, L. M. (2016). A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. *Nature*, 531(7593), 185–90.
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 92–147.
- Komisaruk, B. R. (1970). Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 70(3 PART 1), 482–492.
- Landfield, P. W., Mcgaugh, J. L., & Tusa, R. J. (1972). Theta rhythm: A temporal correlate of memory storage processes in the rat. *Science*, 175(4017), 87–89.
- Lee, A. K., Epsztein, J., & Brecht, M. (2009). Head-anchored whole-cell recordings in freely moving rats. *Nature Protocols*, 4(3), 385–392.
- Lee, A. K., & Wilson, M. A. (2002). Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*, 36(6), 1183–1194.
- Macrides, F., Eichenbaum, H. B., & Forbes, W. B. (1982). Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2(12), 1705–17.
- Maier, N., Tejero-Cantero, Á., Dorn, A. L., Winterer, J., Beed, P. S., Morris, G., ... Schmitz, D. (2011). Coherent Phasic Excitation during Hippocampal Ripples. *Neuron*, 72(1), 137–152.

Marder, E., O'Leary, T., & Shruti, S. (2014). Neuromodulation of Circuits with Variable Parameters: Single Neurons and Small Circuits Reveal Principles of State-Dependent and Robust Neuromodulation. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 329–346.

Margrie, T. W., Brecht, M., & Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 444(4), 491–498.

McGinley, M. J., Vinck, M., Reimer, J., Batista-Brito, R., Zagha, E., Cadwell, C. R., ... McCormick, D. A. (2015). Waking State: Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses. *Neuron*, 87(6), 1143–1161.

O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51(1), 78–109.

Polack, P. O., Friedman, J., & Golshani, P. (2013). Cellular mechanisms of brain state-dependent gain modulation in visual cortex. *Nature Neuroscience*, 16(9), 1331–9.

Pospischil, M., Piwkowska, Z., Bal, T., & Destexhe, A. (2009). Extracting synaptic conductances from single membrane potential traces. *Neuroscience*, 158(2), 545–552.

Rebola, N., Carta, M., & Mulle, C. (2017). Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding. *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group.

Reimer, J., Froudarakis, E., Cadwell, C. R., Yatsenko, D., Denfield, G. H., & Tolias, A. S. (2014). Pupil Fluctuations Track Fast Switching of Cortical States during Quiet Wakefulness. *Neuron*, 84(2), 355–362.

Schneider, D. M., Nelson, A., & Mooney, R. (2014). A synaptic and circuit basis for corollary discharge in the auditory cortex. *Nature*, 513(7517), 189–194.

Sun, Q., Sotayo, A., Cazzulino, A. S., Snyder, A. M., Denny, C. A., & Siegelbaum, S. A. (2017). Proximodistal Heterogeneity of Hippocampal CA3 Pyramidal Neuron Intrinsic Properties, Connectivity, and Reactivation during Memory Recall. *Neuron*, 95(3), 656–672.e3.

Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4), 407–18.

Whishaw, I. Q., & Vanderwolf, C. H. (1971). Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiology & Behavior*, 6(4), 391–7.

Winson, J., & Abzug, C. (1978). Dependence upon behavior of neuronal transmission from perforant pathway through entorhinal cortex. *Brain Research*, 147(2), 422–427.

Zucca, S., Griguoli, M., Malézieux, M., Grosjean, N., Carta, M., & Mulle, C. (2017). Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABA A and GABA B Receptor-Mediated Inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 37(3), 587–598.

Legends

Figure 1- Experimental configuration and data recorded.

- A. Schematic of the head-fixed electrophysiological recording configuration. LFP and whole-cell recordings were performed in CA3. Wheel rotation and pupil diameter of the animal were monitored during the recordings.
- B. Example trace of the sub- and suprathreshold responses of a CA3 PC to injected current pulses (10 pulses, from -80 pA to 280 pA).
- C. Example trace of a simultaneous current-clamp recording from a CA3 PC showing spontaneous action potentials (membrane potential, black), aligned with the nearby LFP (LFP, black) and the corresponding locomotor velocity (running speed, green) and pupil diameter changes (pupil dilation, blue) of the animal.
- D. Confocal fluorescent image of a 100- μ m-thick coronal section of dorsal hippocampus (left; 20x) with a single CA3 PC (right; 40x) filled with biocytin during whole-cell recording and visualized by post hoc labeling with Alexa Fluor 488. Note the presence of the pipette track above the filled CA3 PC.

Figure 1

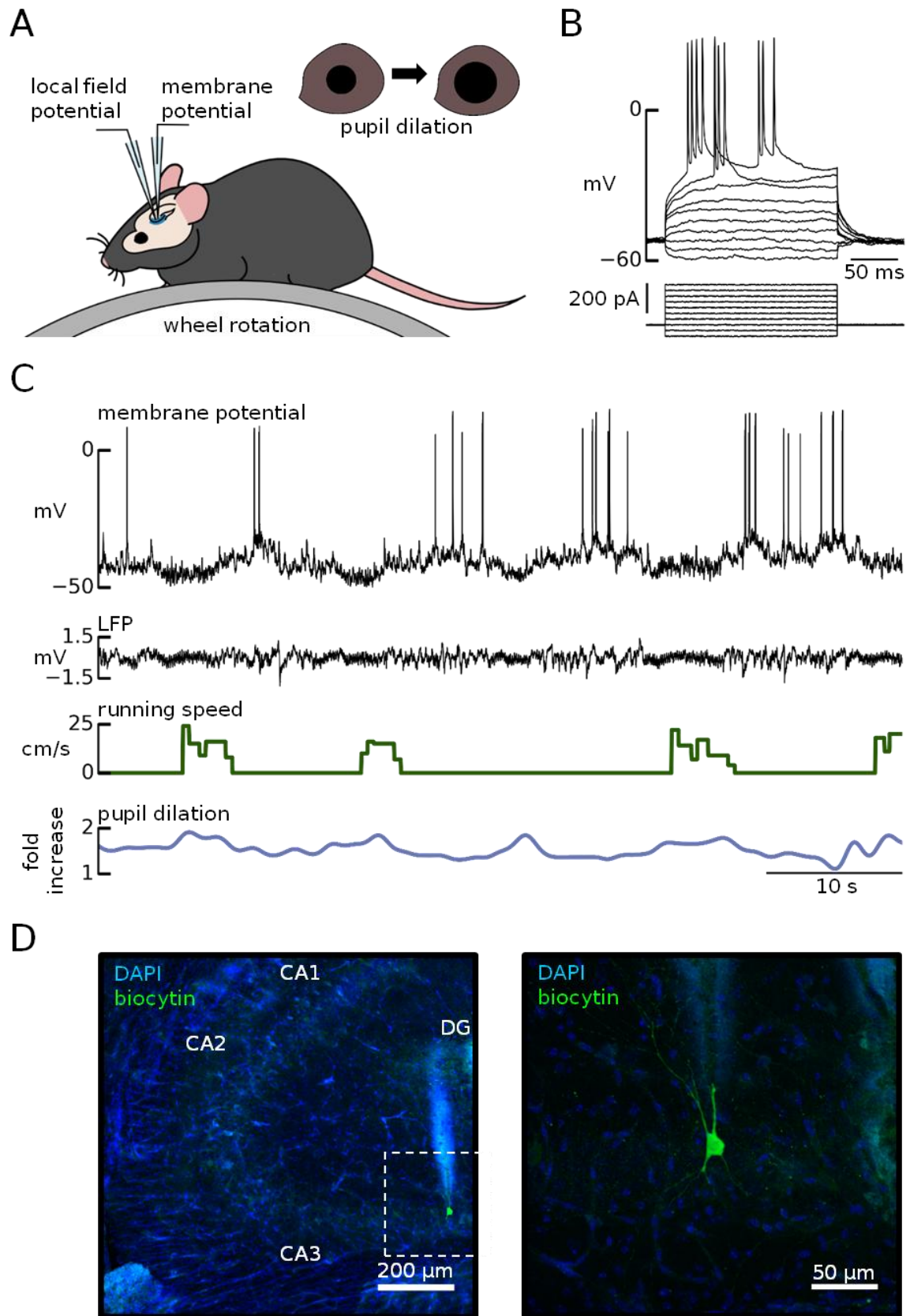


Figure 2 - Brain state classification and characterization.

- A. Example traces of LIA (brown), run theta (dark green) and rest theta (light green). Similar color scheme is used throughout.
- B. Top: One minute LFP recording from CA3 with detected LIA, run theta and rest theta. Middle: Corresponding spectrogram showing z-scored LFP power between 0 and 16 Hz. Note the high broadband power present during LIA and narrow frequency band during theta events. Bottom: Theta/delta power ratio superimposed with total 0.5-80 Hz power, used in state detection. Velocity of the animal is shown below. Note the high theta/delta powers ratio during events of theta and peaks of total power during LIA events.
- C. Representation of the brain states LIA, run theta and rest theta over a full recording session.
- D. Cumulative distribution of the duration (left) and inter-event interval (right) of the different states. Run theta events lasted longer than rest theta and LIA events (4.02 ± 1.89 s [n = 519 events] for run theta, 2.37 ± 1.11 s [n = 371 events] for rest theta, 3.07 ± 1.11 s [n = 450 events] for LIA, $p < 0.001$ for both pairs). LIA events lasted longer than rest theta ($p < 0.001$). All data are expressed in median $\pm$ average absolute deviation from the median unless otherwise stated. Run and rest theta occurred at a similar frequency ($p = 0.158$). Both types of theta occurred more often than LIA (17.73 ± 18.03 s [n = 519 events] for run theta, 19.14 ± 23.75 s [n = 371 events] for rest theta, 23.12 ± 21.93 s [n = 450 events] for LIA, run theta vs LIA $p < 0.001$, rest theta vs LIA $p = 0.023$).
- E. Total percent of time detected for each state over all the recording sessions. Over 269.6 minutes of recording (mean per cell = 7.7 minutes, range??), there were a total of 39.1 minutes of run theta (14.5%), 17.0 minutes of rest theta (6.3%), and 26.7 minutes of LIA (9.9%). The remaining 186.9 minutes (69.3%) were left unlabeled.
- F. Pupil diameter (expressed as fold increase from the minimum) during each brain state, for the subset of sessions in which the pupil diameter was recorded (n = 12 cells). The pupil dilated the same amount for run and rest theta ($p=0.354$), but was more dilated during both types of theta events than during LIA (1.63 ± 0.15 fold [n = 122 events] for run theta, 1.6 ± 0.21 fold [n = 85 events] for rest theta, 1.34 ± 0.12 fold [n = 87 events] for LIA, $p < 0.001$ for both pairs).
- G. Theta/delta power ratio for each brain state. The z-scored theta/delta power was larger during theta than during LIA (1.19 ± 0.51 [n = 519 events] for run theta, 0.82 ± 0.46 [n = 371 events] for rest theta, -0.31 ± 0.15 [n = 450 events] for LIA, $p < 0.001$ for both pairs). This ratio was also larger during run theta compared to rest theta ($p < 0.001$).
- H. Delay between the start of theta and start of running. Inset shows the average increase in theta preceding the average increase in velocity (grey) for all events (n = 517) in all cells recorded (scale bar represents 1 s, 1 unit of z-scored theta/delta ratio, 5 cm/s). Running started significantly after the start of theta (1.3 ± 5.02 s, $p < 0.001$).

Figure 2

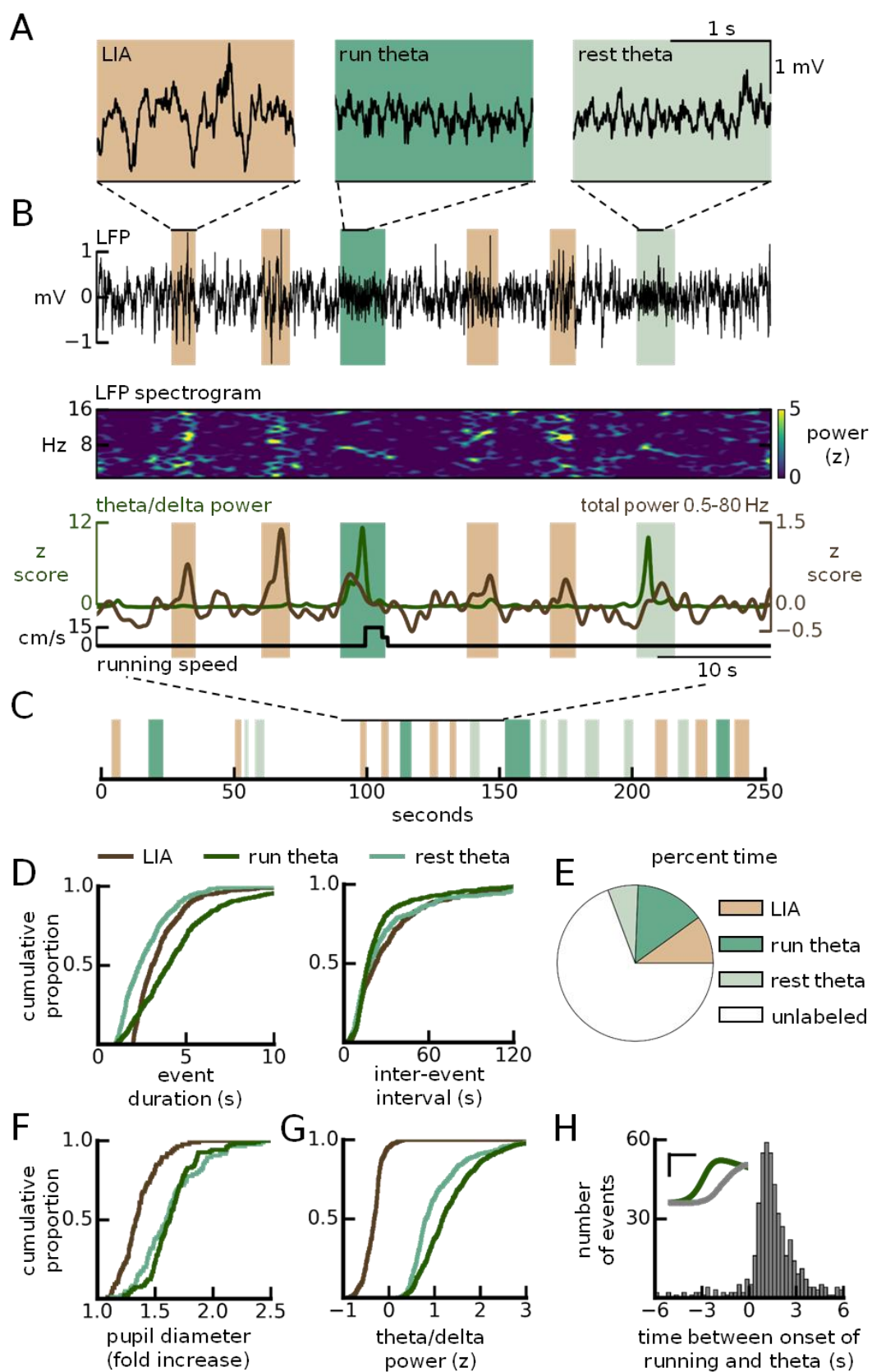


Figure 3 - CA3 pyramidal cells decrease their membrane potential and firing rate during theta.

- A. Example trace showing a whole-cell recording of a CA3 PC (top), with simultaneous theta/delta power ratio of the nearby LFP and the running speed of the mouse (middle). Blue trace superimposed on the raw Vm is the smoothed Vm after spike removal. Bottom: examples of Vm modulation during one rest theta and one run theta event.
- B. Top: Spectrogram of the average LFP (z-scored within frequency bands) triggered by transitions to theta (time = 0, dotted line) showing an increase of power in the theta band (6-9 Hz). Middle: Average Vm traces during theta onset of an example hyperpolarizing (blue) and depolarizing (red) cell, as well as the grand average over all events (grey) (n = 890, shaded areas represent $\pm$ sem). Bottom: Color plot showing the Vm of CA3 PCs triggered by transition to theta normalized to 2.5 to 0.5 s before start of theta. Blue represents Vm hyperpolarization, red Vm depolarization. Each cell is represented in between black ticks. Cells are ordered depending on their average Vm modulation during theta, with depolarizing cells on top and hyperpolarizing cells at the bottom of the plot. Events within each cell are ordered by the time in which they occurred in the recording. Red and blue arrows indicate the sample cells shown in the average traces above.
- C. Distribution of the magnitude of change in Vm at the onset of theta (n = 857 events, bin size = 0.5 mV). Events are colored according to whether there was a hyperpolarization (blue), depolarization (red) or no significant change (white). Similar color scheme is used throughout the figures. Inset: pie chart of the different event types (45.7% hyperpolarizing [n = 392 events], 25.9% depolarizing [n = 222 events], 28.3% no change [n = 243 events]). Compared to a shuffled data set, there were significantly more hyperpolarizing events and less depolarizing and nonsignificant events ($p < 0.001$ for all categories) than chance level.
- D. Comparison of Vm modulation during theta for run [n = 501] and rest [n = 356] events (bin size = 1 mV). Inset: bar charts of percent event type (hyperpolarizing, depolarizing, or no change) for run (top) and rest (bottom) theta events. All types of events occurred at a similar frequency during run and rest theta ($p=0.417$ for hyperpolarizing, $p=0.802$ for depolarizing, $p=0.219$ for no change).
- E. Distribution of cells' average Vm change during theta (bin size = 1 mV). Inset: pie chart of the different cell types (16 cells were hyperpolarizing, 3 cells were depolarizing and 16 cells showed no significant modulation towards one specific direction).
- F. Firing rate of CA3 PCs during theta. Left: raster plot (top) and peri-stimulus time histogram (PSTH, bottom) showing the firing activity of a significantly hyperpolarizing cell. In the raster plot, a single tick represents a single spike and each line is a transition to theta triggered at time 0. The PSTH represents the firing rate of the same cell for all theta transitions triggered at time 0. Middle: same, but for a significantly depolarizing cell. Right: mean change in firing rate versus mean change in Vm during theta. Dots represent average changes for a single cell (n = 35). Filled dots represent significant Vm modulation during theta, color represent direction of modulation.

Figure 3

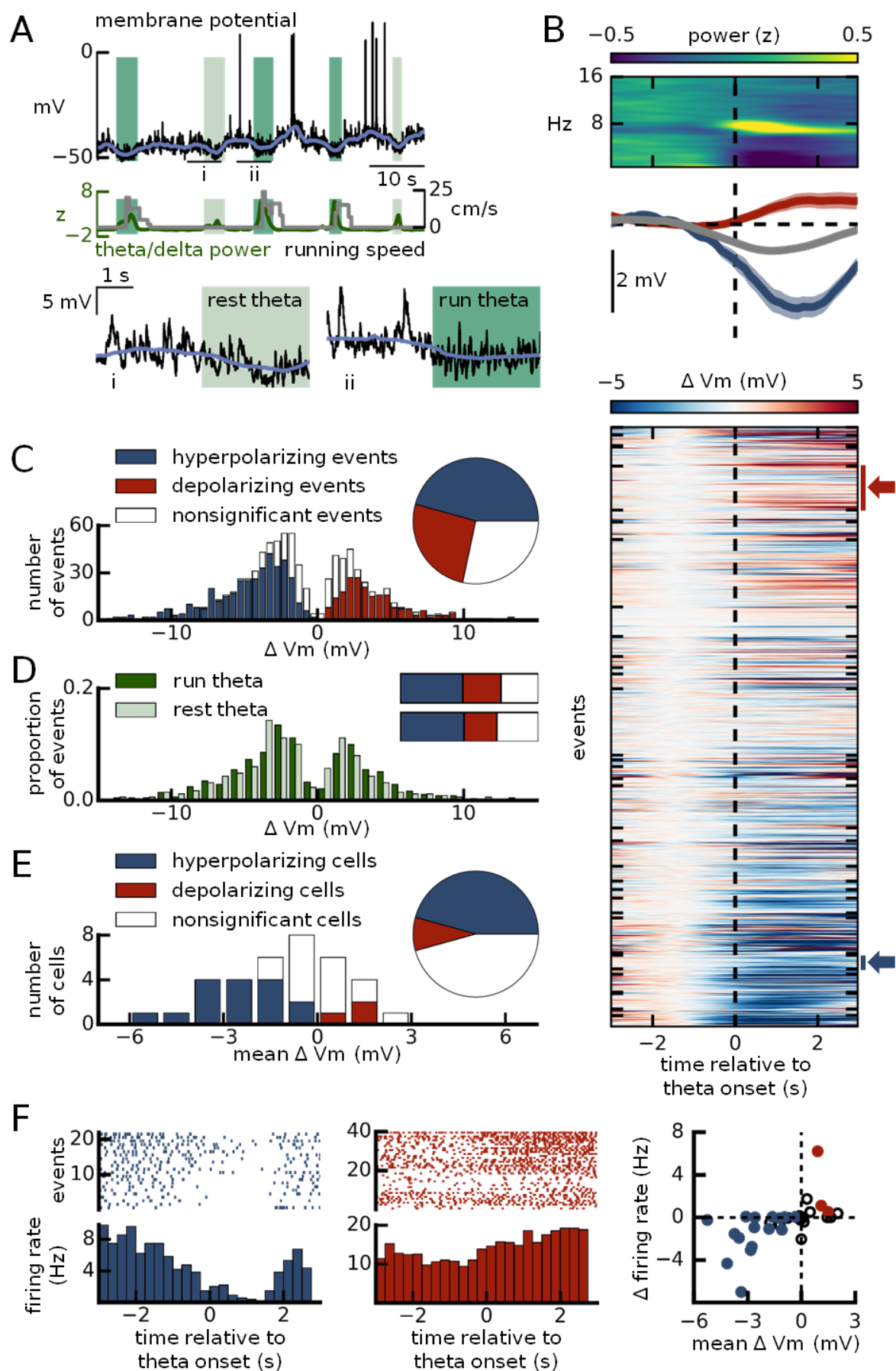


Figure 4 - CA3 pyramidal cells increase their membrane potential during LIA.

- A. Example trace showing a whole-cell recording of a CA3 PC (top) with simultaneous total power (0.5-80 Hz) of the nearby LFP (middle). Previously detected theta events are shown in grey since they were excluded from being classified as LIA states. Blue trace superimposed on the raw Vm is the smoothed Vm after spike removal. Bottom: two examples of Vm modulation during LIA events.
- B. Spectrogram of the average LFP (z-scored within frequency bands) triggered by transitions to LIA (time = 0, dotted line) showing an increase in broadband power after the start of LIA. Note that transitions to LIA were associated with an increase in delta (0.5–3.5 Hz) and beta (10–20 Hz) LFP power. Middle: Average Vm traces during theta onset of an example hyperpolarizing (blue) and depolarizing (red) cell, as well as the grand average over all events (grey) (n = 445, shaded areas represent $\pm$ sem). Bottom: Color plot showing the Vm of CA3 PCs triggered by transition to LIA normalized to 4 to 2 s before start of LIA. Blue represents Vm hyperpolarization, red Vm depolarization. Each cell is represented in between black ticks. Cells are ordered depending on their Vm modulation during LIA, with depolarizing cells on top and hyperpolarizing cells at the bottom of the plot. Events within each cell are ordered by the time in which they occurred in the recording. Red and blue arrows indicate the sample cells shown in the average traces above.
- C. Distribution of the magnitude of change in Vm at the onset of LIA (n = 433 events, bin size = 0.5 mV). Events are colored according to whether there was a hyperpolarization (blue), depolarization (red) or no significant change (white). Inset: pie chart of the different event types (19.2% hyperpolarizing [n = 83 events], 44.1% depolarizing [n = 191 events], 36.7% no change [n = 159 events]). Compared to a shuffled data set, there were significantly less hyperpolarizing events ($p < 0.001$) and more depolarizing events ($p = 0.001$) than expected by chance.
- D. Distribution of cells' average Vm change during LIA (bin size = 1 mV). Inset: pie chart of the different cell types (2 cells were hyperpolarizing, 8 cells were depolarizing and 24 cells showed no significant modulation towards one specific direction).
- E. Firing rate of CA3 PCs during LIA. Left: raster plot (top) and peri-stimulus time histogram (PSTH, bottom) showing the firing activity of a significantly hyperpolarizing cell. In the raster plot, single tick represent single spike and each line is a transition to LIA triggered at time 0. The PSTH represents the firing rate of the same cell for all LIA transitions triggered at time 0. Middle: same, but for a significantly depolarizing cell. Right: mean change in firing rate versus mean change in Vm during LIA. Dots represent average changes for a single cell (n = 34). Filled circles represent significant Vm modulation during LIA, color represent direction of modulation.
- F. Comparison of direction of Vm modulation during theta versus LIA events. Left: example trace showing a whole-cell recording of a CA3 PC during LIA and theta. Right: Average change in Vm during theta versus average change in Vm during LIA. Filled circles represent significant modulation during LIA, color represent direction of modulation. Note that every cell significantly modulated during LIA also hyperpolarizes during theta.

Figure 4

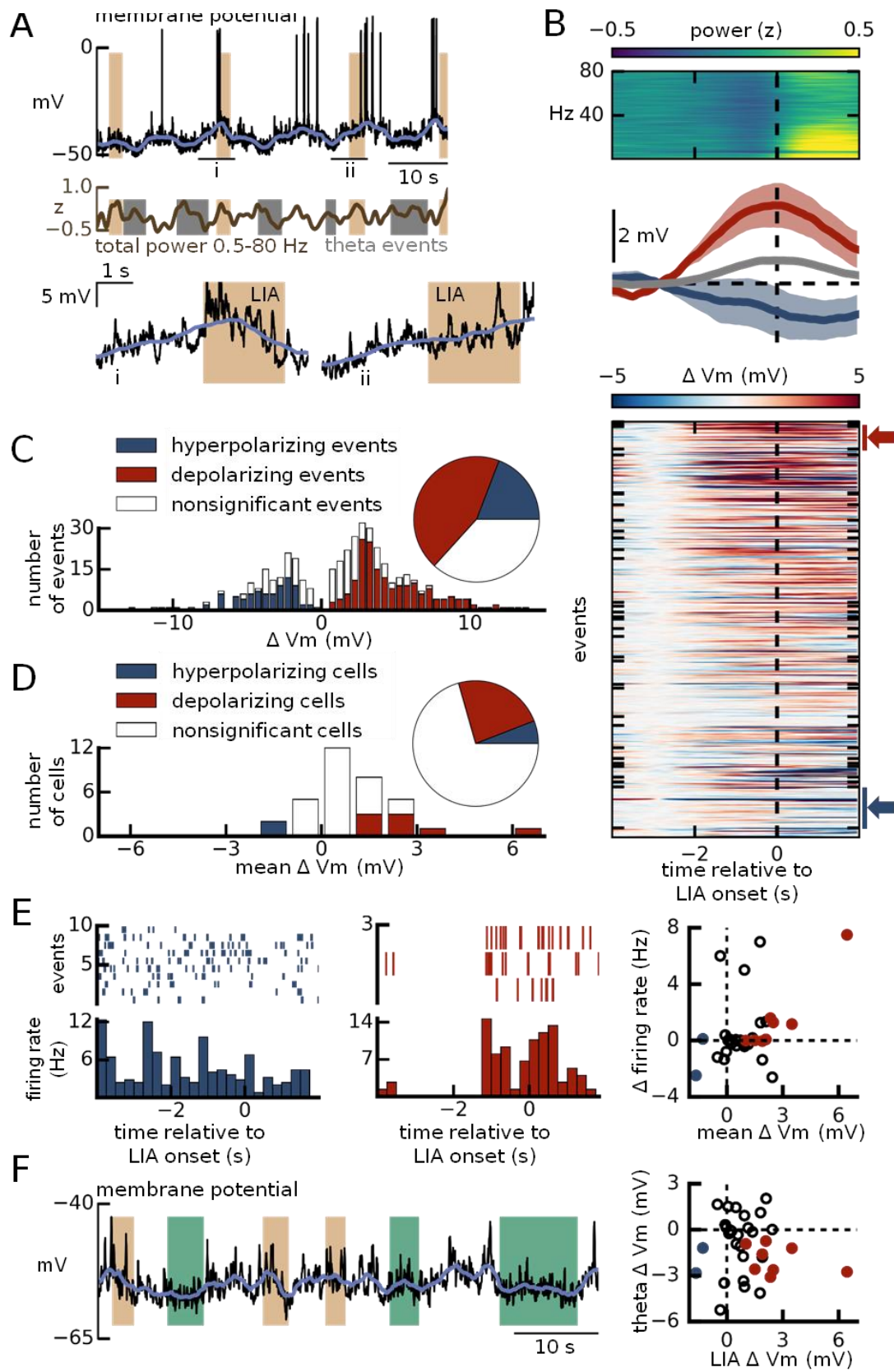


Figure 5 - Pupil diameter changes correlate with different brain states but not with event-dependent changes in Vm of CA3 pyramidal cells.

- A. Example pupil diameter trace with theta (green) and LIA (brown) events marked. Blue and red lines indicate whether the Vm from the simultaneously recorded cell hyperpolarized or depolarized, respectively.
- B. Color plots showing pupil diameter triggered by transition to theta (left, $n = 200$ events) and LIA (right, $n = 76$ events) from the subset of recordings with pupil diameter tracking ($n = 12$ cells). Events are organized according to the length of the brain state, with onset and offset represented by the two black dotted lines.
- C. Pupil diameter during theta (left) and LIA (right) events, separated by whether the event co-occurred with a significant hyperpolarization or depolarization in the simultaneously recorded Vm. There is no significant difference in the pupil diameter between hyperpolarizing and depolarizing events for either state (1.75 ± 0.21 [$n = 96$ events] for theta hyperpolarizing, 1.74 ± 0.2 [$n = 50$ events] for theta depolarizing, $p = 0.956$) (1.26 ± 0.11 [$n = 10$ events] for LIA hyperpolarizing, 1.24 ± 0.09 [$n = 31$ events] for theta depolarizing, $p = 0.603$). Boxplots show median (center line), $\pm$ shuffled confidence interval of the median (notch), 25th and 75th percentiles (box), and 5th and 95th percentiles (whiskers).

Figure 5

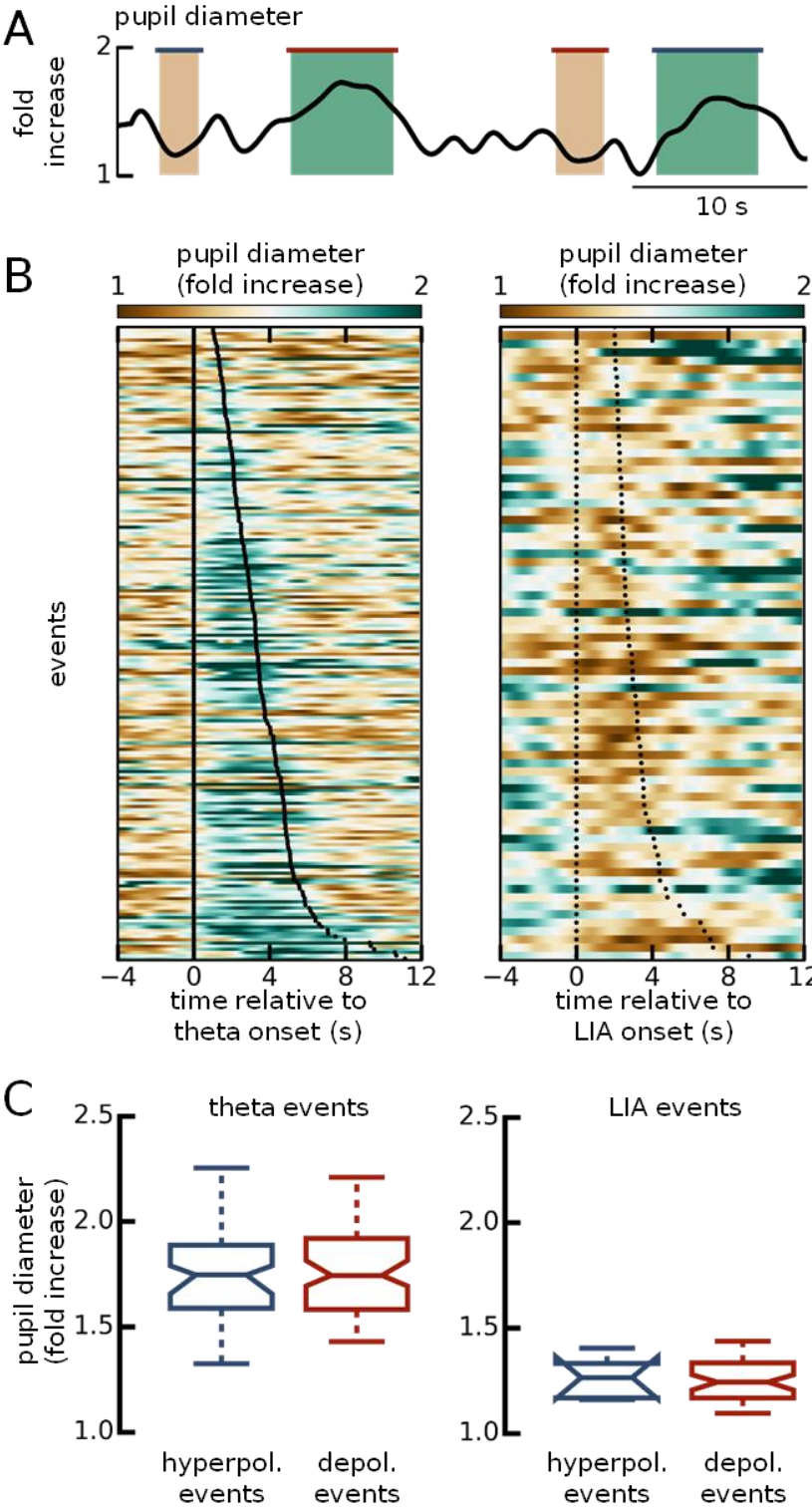


Figure 6 - Resting membrane potential and input resistance influences the intracellular modulation of CA3 PCs during brain states.

- A. Left: V_m changes during theta (ΔV_m) versus the initial resting membrane potential (initial V_m) of the cell. Black solid line shows corresponding linear regression ($r = -0.477$, $p = 7.00 \times 10^{-13}$). Right: distribution of the changes in V_m during theta for events when no holding current was injected in the cell (0 Ih) and when negative current was applied (-Ih). Inset: bar charts of percent event type (hyperpolarizing, depolarizing, or no change) for 0 Ih (top) and -Ih (bottom) theta events. All types of events occurred at a similar frequency regardless of the injected current ($p=0.118$ for hyperpolarizing, $p=0.057$ for depolarizing, $p=0.273$ for no change).
- B. Left: V_m changes during LIA (ΔV_m) versus the initial resting membrane potential (initial V_m) of the cell. Black solid line shows corresponding linear regression ($r = -0.054$, $p = 0.003$). Right: distribution of the changes in V_m during LIA for events when no holding current was injected in the cell (0 Ih) and when negative current was applied (-Ih). Inset: bar charts of percent event type (hyperpolarizing, depolarizing, or no change) for 0 Ih (top) and -Ih (bottom) theta events. All types of events occurred at a similar frequency regardless of the injected current ($p=0.078$ for hyperpolarizing, $p=0.754$ for depolarizing, $p=0.508$ for no change).
- C. Input resistance of CA3 PCs during theta and LIA for the subset of cells for which resistance measurements were taken ($n = 13$ cells). Left: Average voltage response to current pulses (-100 pA, 100 ms) in two cells during theta (green) and LIA (brown). The cell represented on the left has a higher R_{in} during theta as compared to LIA, and the opposite is true for the other cell. Insets: high resolution trace of the onset of the current pulse, to show bridge balance compensation (scale bar = 1 ms, 5 mV). Right: R_{in} during LIA versus theta. Filled circle represents a significant difference between the two states. Out of 13 cells, 7 had a higher R_{in} during LIA as compared to theta, and 2 had a lower R_{in} during LIA as compared to theta.

Figure 6

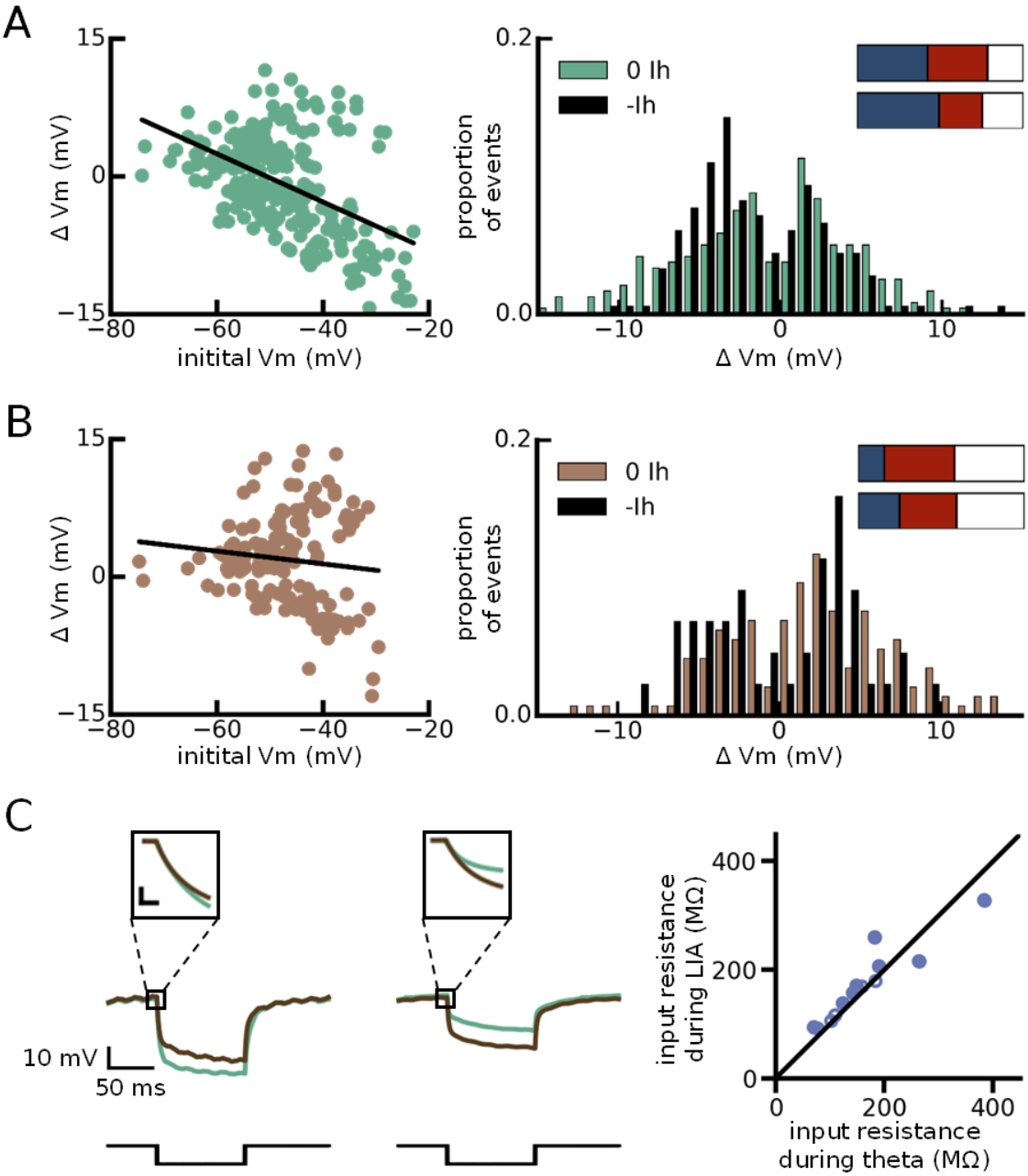
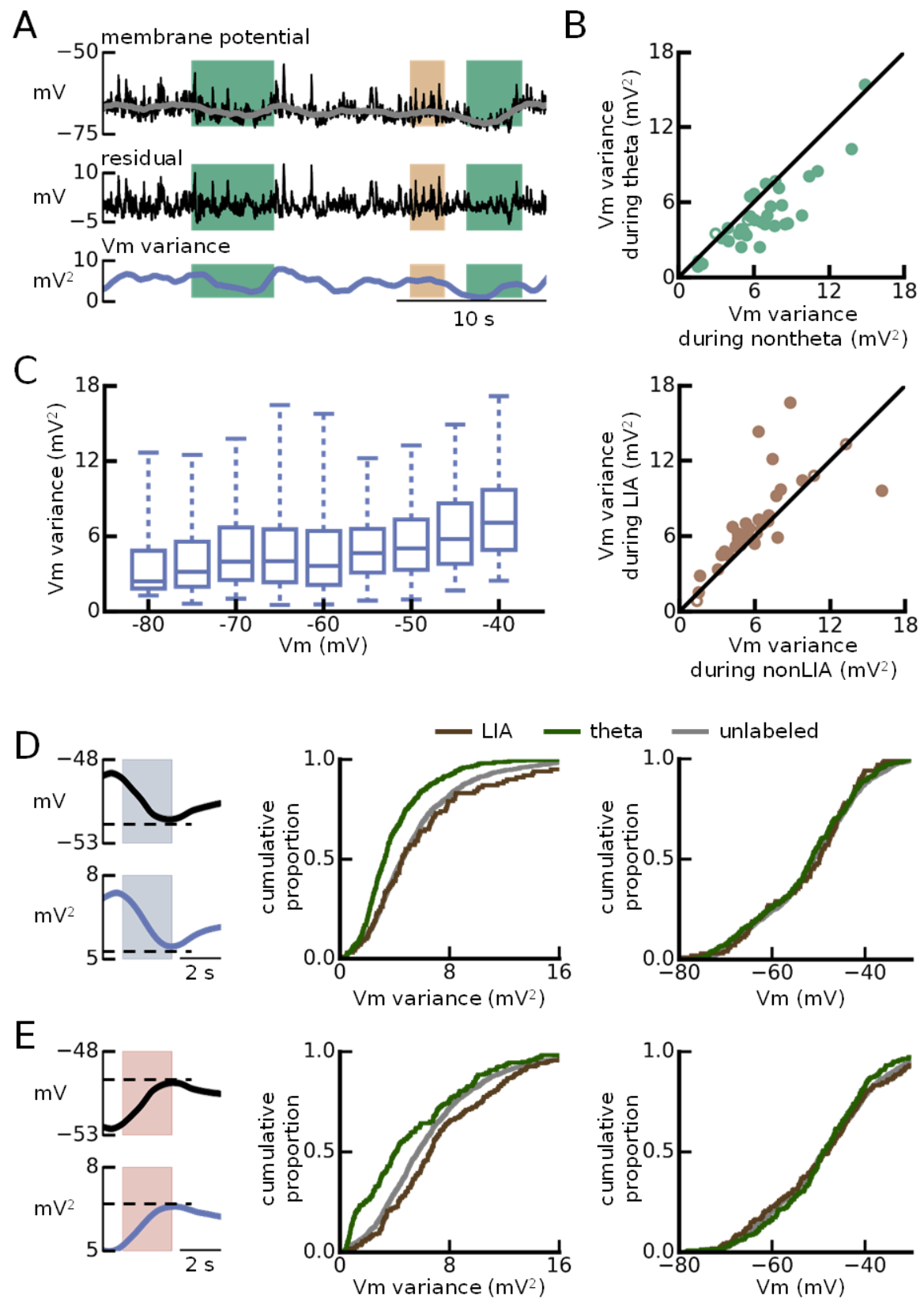


Figure 7 - Variance of membrane potential of CA3 PCs is differentially modulated during theta and LIA

- A. Processing of Vm trace to measure its variance. Top: downsampled Vm after spike removal of a CA3 PC with shading indicating theta (green) and LIA (brown). The grey superimposed trace is after smoothing with a window of 2 seconds. The smoothed Vm is subtracted from the raw Vm to obtain the residual Vm (middle). The variance of the residual Vm trace is calculated over 1-second windows (bottom).
- B. Top: scatter plot showing Vm variance of each cell during theta versus nontheta ($n = 35$ cells). Filled dots represent a significant difference. Over the population of cells, there was a significant decrease in variance during theta ($6.09 \pm 2.21 \text{ mV}^2$ for nontheta, $4.33 \pm 1.86 \text{ mV}^2$ for theta, mean difference = -1.58 mV^2 , $p < 0.001$). Bottom: same as above but for LIA. Over the population of cells, there was a significant increase in variance during LIA ($5.89 \pm 2.15 \text{ mV}^2$ for nonLIA, $6.32 \pm 2.42 \text{ mV}^2$ for LIA, mean difference = 0.96 mV^2 , $p = 0.004$).
- C. Boxplots of Vm variance within bins of Vm. Note that the more the cell is depolarized, the higher the variance. Boxplots show median (center line), 25th and 75th percentiles (box), and 5th and 95th percentiles (whiskers).
- D. Cumulative distributions of variance and Vm of CA3 PCs for all hyperpolarizing events. Left: Average of all hyperpolarizing events Vm (top, black) and variance (bottom, blue, $n = 1948$ events). Dotted line corresponds to the value taken at the end of the change in Vm for each event. Middle: Cumulative proportion of variance during LIA (brown), theta (green) and unlabeled (grey) hyperpolarizing events. Vm variance is lower during theta, but there is no difference in Vm variance between LIA and unlabeled hyperpolarizations ($3.29 \pm 1.82 \text{ mV}^2$ [$n = 421$ events] for theta, $4.55 \pm 3.20 \text{ mV}^2$ [$n = 101$ events] for LIA, $4.62 \pm 2.74 \text{ mV}^2$ [$n = 1426$ events] for unlabeled, $p < 0.001$ for theta vs unlabeled and theta vs LIA, $p = 0.832$ for LIA vs unlabeled). Right: Cumulative proportion of Vm during LIA, theta and unlabeled states during hyperpolarizing events. There is no significant difference between the states ($-51.58 \pm 8.89 \text{ mV}$ [$n = 421$ events] for theta, $-49.80 \pm 8.52 \text{ mV}$ [$n = 101$ events] for LIA, $-51.07 \pm 8.71 \text{ mV}$ [$n = 1426$ events] for unlabeled, Kruskal-Wallis $p = 0.331$).
- E. Cumulative distributions of variance and Vm of CA3 PCs for all depolarizing events. Left: Average of all depolarizing events Vm (top, black) and variance (bottom, blue, $n = 2058$ events). Dotted line corresponds to the value taken at the end of the change in Vm for each event. Middle: Cumulative proportion of variance during LIA, theta and unlabeled depolarizing events. Vm variance is lower during theta, and higher during LIA when compared with unlabeled depolarizing events ($4.22 \pm 3.51 \text{ mV}^2$ [$n = 219$ events] for theta, $6.72 \pm 3.64 \text{ mV}^2$ [$n = 208$ events] for LIA, $5.83 \pm 3.51 \text{ mV}^2$ [$n = 1631$ events] for unlabeled, $p < 0.001$ for theta vs unlabeled and theta vs LIA, $p = 0.008$ for LIA vs unlabeled). Right: Cumulative proportion of Vm during LIA, theta and unlabeled states during depolarizing events. There is no significant difference between the states ($-49.03 \pm 8.24 \text{ mV}$ [$n = 219$ events] for theta, $-47.86 \pm 10.15 \text{ mV}$ [$n = 208$ events] for LIA, $-48.75 \pm 9.51 \text{ mV}$ [$n = 1631$ events] for unlabeled, Kruskal-Wallis $p = 0.985$).

Figure 7



4.3 Discussion

La modulation des propriétés de cellules uniques, telles que leur potentiel de membrane, leur excitabilité, leur activité et leur intégration synaptique permettrait aux circuits neuronaux de générer les oscillations corrélées avec des états cérébraux distincts (Marder et al. 2014). Pour pouvoir étudier ces propriétés cellulaires, il est nécessaire d'enregistrer simultanément (i) l'activité extracellulaire d'une population de neurones et (ii) le potentiel de membrane intracellulaire chez l'animal éveillé. Notre étude décrit pour la première fois les différentes modulations intracellulaires dans les CP de CA3 chez l'animal éveillé lors de différents rythmes hippocampiques. La majorité des CP de CA3 s'hyperpolarisent et ont une variance de leur potentiel de membrane plus faible pendant le rythme theta, entraînant une diminution de leur fréquence de décharge. La vitesse de locomotion de l'animal augmente rapidement après le début du rythme theta, et est donc associée avec l'hyperpolarisation et la diminution de la variance des CP. Cependant, ces changements sont également présents lors de périodes de theta non associées avec un comportement locomoteur. L'amplitude de l'hyperpolarisation est plus importante lorsque le potentiel de membrane est initialement plus dépolarisé, en accord avec une augmentation de la force motrice. Inversement, lors de périodes de repos associées à la LIA, le potentiel de membrane de certaines CP de CA3 se dépolarise, entraînant une augmentation de la fréquence de décharge, et une augmentation de la variance du potentiel de membrane. Une majorité des cellules modulées pendant la LIA sont modulées pendant le theta, représentant probablement une population de CP de CA3 prédisposée à la modulation par l'état cérébral. Dans le néocortex, l'enregistrement de cellules uniques et de leur dynamique intracellulaire lors de différents états cérébraux et comportementaux a permis de décrire les mécanismes cellulaires responsables de différents patrons d'activités des réseaux (Polack et al. 2013, Schneider et al. 2014, Crochet and Petersen 2006). Dans l'hippocampe, la modulation de l'activité d'ensemble de neurones et des oscillations de ces réseaux ont été largement étudiées chez les animaux éveillés se comportant, en particulier dans le contexte du traitement d'informations spatiales (Buzsáki and Moser 2013). Peu de données sont disponibles quant aux mécanismes intracellulaires permettant la génération des activités de réseaux chez l'animal exécutant une tâche comportementale ou lors de différents états de veille. Une analyse détaillée des fluctuations du potentiel de membrane des CP de CA1 et des CG du GD pendant la LIA, la SIA et le rythme theta chez la souris éveillée tête-fixée a été récemment décrite (Hulse et al. 2017). Au cours des transitions à la LIA, la plupart des cellules de CA1 et du GD se dépolarisent et la variance de leur potentiel de membrane augmente. Nous avons observé une modulation similaire dans une partie des CP de CA3. Nous proposons de ce fait que la LIA correspond à un régime hippocampique général, pendant lequel les cellules principales de toutes les sous-régions entrent dans un état plus excitable. Nous émettons l'hypothèse que cet état est en accord avec un transfert efficace de l'information le long du réseau trisynaptique, probablement grâce à la génération et à la propagation des SWR, jouant un rôle dans la consolidation de la mémoire (Buzsáki 2015, Foster and Wilson 2006). Il convient de noter cependant, que parmi les cellules qui ne s'hyperpolarisaient ou ne se dépolarisaient pas significativement pendant la LIA, il semble

y avoir certaines cellules au comportement mixte qui s'hyperpolarisaient et se dépolarisaient lors de différentes périodes de LIA. De futures analyses permettront de séparer statistiquement cette population de cellule d'autres cellules qui elles ne sont réellement pas modulées pendant la LIA. Lors des rythmes theta, les CP de CA3 s'hyperpolarisent, réduisent leur fréquence de décharge, et ont une variance du potentiel de membrane plus faible. Cette modulation n'est pas dépendante de la vitesse de locomotion de l'animal, suggérant que le potentiel de membrane et sa variance dépendent des transitions entre les états cérébraux et non du comportement de l'animal. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'association des oscillations theta avec d'autres mouvements plus fins tels que le mouvement des moustaches, que nous n'avons pas mesuré dans nos expériences. Nous avons également observé que la plupart des CP de CA3 modulées lors des transitions à la LIA étaient également hyperpolarisées lors des transitions au rythme theta, suggérant qu'une sous-population des CP de CA3 est prédisposée à être modulée pendant les transitions d'états et reflètent précisément les fluctuations entre différents états cérébraux.

Dans une précédente étude, les transitions au rythme theta, bien qu'accompagnées d'une augmentation de la vitesse de locomotion et du diamètre de la pupille de l'animal, ne semblent pas avoir une influence sur le potentiel de membrane ou sa variance dans les CP de CA1 ou les cellules du GD (Hulse et al. 2017). De ce fait, le rythme theta semble influencer spécifiquement les CP de CA3. Cela suggère un contrôle différent des sous-régions hippocampiques par des mécanismes distincts. Ce contrôle pourrait être réalisé par des neuromodulateurs, ou bien par une régulation locale de la balance inhibition/excitation. De plus, il est important de noter que nous avons enregistré trois cellules se dépolarisant pendant les transitions au rythme theta. Ces cellules augmentent également leur fréquence de décharge. L'encodage des mémoires spatiale et épisodique a lieu lors des oscillations theta, certaines cellules doivent donc être actives pendant ces oscillations, pour permettre le traitement des informations et leur transfert à CA1. Le fait que la plupart des CP de CA3 s'hyperpolarise alors qu'une sous-population se dépolarise pourrait indiquer un mécanisme de sélection des CP pertinentes pour une situation comportementale ou sensorielle donnée, tout en réduisant le bruit synaptique dans le circuit de CA3. Il serait intéressant de déterminer si ces différentes populations correspondent à des CP morphologiquement différentes (Sun et al. 2017, Hunt et al. 2018). Dans le néocortex, le potentiel de membrane des neurones et leur variance présentent une modulation dépendante de l'état d'éveil en "forme de U" (U-shaped), représentée par le diamètre de la pupille. Une hyperpolarisation stable a lieu lors d'état d'éveil moyen, et une dépolarisation est présente lors de périodes phasique ou tonique d'hyper-éveil, dont les périodes de locomotion (McGinley et al. 2015). Même si le diamètre pupillaire est corrélé à des états spécifiques du LFP de CA3, il ne prédit pas les fluctuations du potentiel de membrane lors de transitions à la LIA ou au theta. Pour pouvoir intégrer nos données dans un modèle de niveau d'éveil (en forme de U, binaire, ou sigmoïde), nous devrions analyser la modulation intracellulaire des CP de CA3 lors d'un niveau intermédiaire d'éveil. En effet, la LIA est présente lors de périodes d'éveil faible, alors que theta représente un état d'éveil élevé. Un niveau intermédiaire d'éveil est représenté dans l'hippocampe par l'activité faible et irrégulière (SIA, Jarosiewicz and Skaggs 2004). La SIA est présente dans l'hippocampe lors de transitions à un état de vigilance lorsqu'aucun mouvement locomoteur n'est présent, tel que lors d'un arrêt abrupte de mouvement volontaire (Whishaw and Vanderwolf 1971). Contrairement

à la LIA, où la réactivation a lieu, la SIA a été décrite comme étant un état où les cellules de l'hippocampe codent pour la position de l'animal lors de périodes d'immobilités (Jarosiewicz et al. 2002, Kay et al. 2016). Cette propriété a été démontrée pour les CP de CA1 et CA2, mais celles de CA3 ne semblent pas coder pour la position de l'animal immobile (Kay et al. 2016). Cela suggère que la SIA dans CA3 pourrait avoir un rôle spécifique et donc un impact différent sur les CP. Dans nos expériences, nous n'avons jusqu'à présent pas pu détecter avec certitude les périodes de SIA. Cela pourrait être dû à notre configuration expérimentale, où l'enregistrement du LFP à l'aide d'une pipette en verre rend l'analyse du signal difficile en comparaison avec un LFP enregistré avec une électrode aux sites d'enregistrements multiples comme une sonde de silicone, où le LFP peut être obtenu sur différents canaux. Une autre possibilité serait que la SIA dans CA3 a lieu moins fréquemment ou avec des propriétés différentes que dans d'autres parties de l'hippocampe, nécessitant une optimisation de la détection de la SIA décrite dans la littérature pour les autres sous-régions hippocampiques.

L'hyperpolarisation de la membrane lors de transitions au rythme theta pourrait s'expliquer par une augmentation des entrées inhibitrices et une diminution des entrées excitatrices, par la modulation des propriétés intrinsèques du neurone en relation avec l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques, ou plus probablement par une combinaison de ces deux paramètres. Une réduction de la variance du potentiel de membrane serait en accord avec une diminution des entrées synaptiques, cependant il est difficile de prédire si ces changements sont de nature excitatrice ou inhibitrice. Une augmentation des entrées GABAergiques entraînerait une hyperpolarisation, avec une augmentation initiale du bruit synaptique, suivie par une diminution à mesure que le potentiel de membrane se rapproche du potentiel d'inversion des ions Cl^- . Une diminution des entrées excitatrices est attendue en conséquence à la réduction d'activité des PC de CA3 lors des transitions au rythme theta, entraînant une diminution de l'activité des récurrentes de CA3, mais n'est peut-être pas la cause de l'hyperpolarisation initiale observée à la transition au rythme theta. De futures analyses sont nécessaires pour pouvoir extraire cette information des enregistrements du potentiel de membrane des cellules (Pospischil et al. 2009, Bédard et al. 2012). Nous avons examiné la modulation de la résistance d'entrées des CP de CA3 lors de changements d'états cérébraux, qui pourrait refléter des changements d'excitabilité intrinsèque. Les transitions à la LIA ou au rythme theta n'étaient pas associées à une modulation de la résistance d'entrée des neurones. Il est possible que cette mesure ne soit pas assez précise pour permettre de conclure que la résistance des neurones n'est pas modulée pendant les différents états. Cependant, en comparant la résistance d'entrée pendant la LIA par rapport à celle pendant les rythmes theta, nous avons observé que la résistance d'entrée des neurones est plus élevée pendant la LIA que pendant les rythmes theta. La libération de neuromodulateurs tels que l'acétylcholine, la sérotonine ou la noradrénaline, est corrélée avec des changements d'état cérébral, et pourrait entraîner des changements de l'excitabilité intrinsèque des neurones ainsi que de l'activité présynaptique (i.e. interneurones GABAergiques) (Polack et al. 2013). De prochaines études permettront de déterminer si ces neuromodulateurs jouent un rôle dans la modulation des CP de CA3.

Des changements rapides d'état cérébral dans l'hippocampe sont reflétés par des changements coordonnés des dynamiques intracellulaires des CP de CA3. Le potentiel de membrane et sa

variance sont corrélés avec les transitions à la LIA et au rythme theta. Ces résultats mettent en évidence un rôle spécifique des CP de CA3 lors du rythme theta en comparaison avec CA1 et le GD (Hulse et al. 2017) et les neurones néocorticaux (McGinley et al. 2015). Lors de cette période d'éveil élevé, une proportion des CP de CA3 est sélectivement activée alors que la plupart des autres CP sont silencieuses. En revanche, pendant la LIA, les cellules principales du GD, de CA3 et de CA1 se dépolarisent, augmentant probablement la capacité des réseaux à générer les SWR et transférer les informations pertinentes entre les différentes régions lors de la consolidation de la mémoire.

PERSPECTIVES

5.1 Neuromodulation : rôle de l'acétylcholine

La modulation des cellules pyramidales de CA3 lors des périodes de theta et/ou de LIA pourrait être provoquée par l'effet neuromodulateur de l'acétylcholine. En effet, l'acétylcholine ainsi que d'autres neuromodulateurs tels que la noradrénaline jouent un rôle dans la modulation des états de veille (Aston-Jones and Cohen 2005, Herrero et al. 2008, Goard and Dan 2009, Polack et al. 2013). Les projections cholinergiques peuvent être activées de manière tonique lors de périodes de locomotion et leur activation peut être également corrélée à des périodes soutenues de dilatation de la pupille (Reimer et al. 2016). Dans l'hippocampe, le rythme theta est bloqué par des lésions combinées des entrées cholinergiques et GABAergiques provenant du septum médian (Yoder and Pang 2005). Les interneurons de l'hippocampe sont impliqués dans le rythme theta (Klausberger et al. 2003), et la modulation cholinergique dépolarise certains interneurons hippocampiques (Chapman and Lacaille 1999, McQuiston and Madison 1999, Alkon and Albuquerque 2001), ce qui pourrait augmenter leur activité pendant les rythmes theta. L'acétylcholine peut agir sur deux types de récepteurs distincts : nicotiques et muscariniques. Les premiers sont des canaux cationiques activés par l'acétylcholine, provoquant en quelques millisecondes une dépolarisation et une excitation. Les seconds, les récepteurs muscariniques, couplés aux protéines G et donc plus lents, peuvent induire des réponses excitatrices ou inhibitrices. En plus de pouvoir dépolariser certains interneurons de l'hippocampe, l'activation des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine peut diminuer la libération de GABA (Pitler and Alger 1992). Ces effets opposés de l'acétylcholine peuvent apparaître comme paradoxaux, mais des modèles démontrent que ces effets combinés permettent de réduire le bruit de fond dans le réseau et donc d'intensifier l'impact de la décharge de neurones à la suite de stimulus sensoriels (Patil and Hasselmo 1999). La modulation cholinergique permet également de réguler la rythmicité de certains interneurons, et pourrait donc contribuer aux dynamiques nécessaires à l'encodage et au rappel efficace d'informations par l'hippocampe (Chapman and Lacaille 1999). Dans CA3, les récepteurs muscariniques et nicotiques sont présents sur les CP et sur les interneurons (Levey et al. 1995, Albuquerque et al. 1997). L'activation des récepteurs muscariniques a un effet suppresseur sur la transmission excitatrice au niveau des connexions récurrentes dans le *stratum radiatum*. La modulation synaptique directe par les récepteurs cholinergiques dans CA3 n'est évidente qu'aux synapses formées par les connexions récurrentes, où l'inhibition synaptique refléterait l'inhibition de canaux calciques présynaptiques entraînée par l'activation de récepteurs muscariniques. De plus, les synapses formées par les fibres moussues peuvent également être modulées par l'action de la muscarine, agoniste des

récepteurs muscariniques, par multiples mécanismes indirects (Vogt and Regehr 2001).

Lors de comportements actifs, comme la perception de l'environnement à l'aide du mouvement de moustaches chez la souris, la désynchronisation des signaux dans le cortex somatosensoriel est accompagné d'une augmentation des entrées cholinergiques, qui diminue l'activité spontanée des neurones excitateurs de la couche 2/3 du cortex (Eggermann et al. 2014). Dans le cortex visuel, la neuromodulation entraînée par la libération d'acétylcholine et de noradrénaline lors de changements d'états de vigilance contrôle le gain et le ratio signal/bruit des neurones corticaux (Polack et al. 2013).

Ces données suggèrent que l'acétylcholine pourrait jouer un rôle dans la modulation intracellulaire des CP de CA3 lors des différents états cérébraux que nous avons rapporté dans la partie Résultats de ce mémoire. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des enregistrements en configuration cellule entière des CP de CA3 chez l'animal éveillé, et avons appliqué lors de ces enregistrements une combinaison d'antagonistes cholinergiques muscariniques et nicotiniques (respectivement : atropine et mecamylamine, 1 mM) pour étudier l'impact de l'inhibition de ces récepteurs sur l'activité intracellulaire des CP de CA3. Le nombre de neurones récoltés pour ces expériences étant à ce jour faible (n=5), nous rapportons ici une analyse préliminaire de ces données, dépourvue de statistiques, dans le but de valider nos expériences avant d'augmenter la quantité de données, étape nécessaire pour pouvoir répondre à l'hypothèse formulée.

Les figures 5.1 et 5.2 montrent les variations du potentiel de membrane des neurones enregistrés avant (panels de gauche) et après (panels de droite) application des antagonistes cholinergiques, lors de transitions aux rythmes theta (Fig. 5.1) et LIA (Fig. 5.2). L'inhibition des récepteurs cholinergique semble avoir un impact plus important lors de transitions aux périodes de LIA que lors de transitions aux périodes de rythme theta.

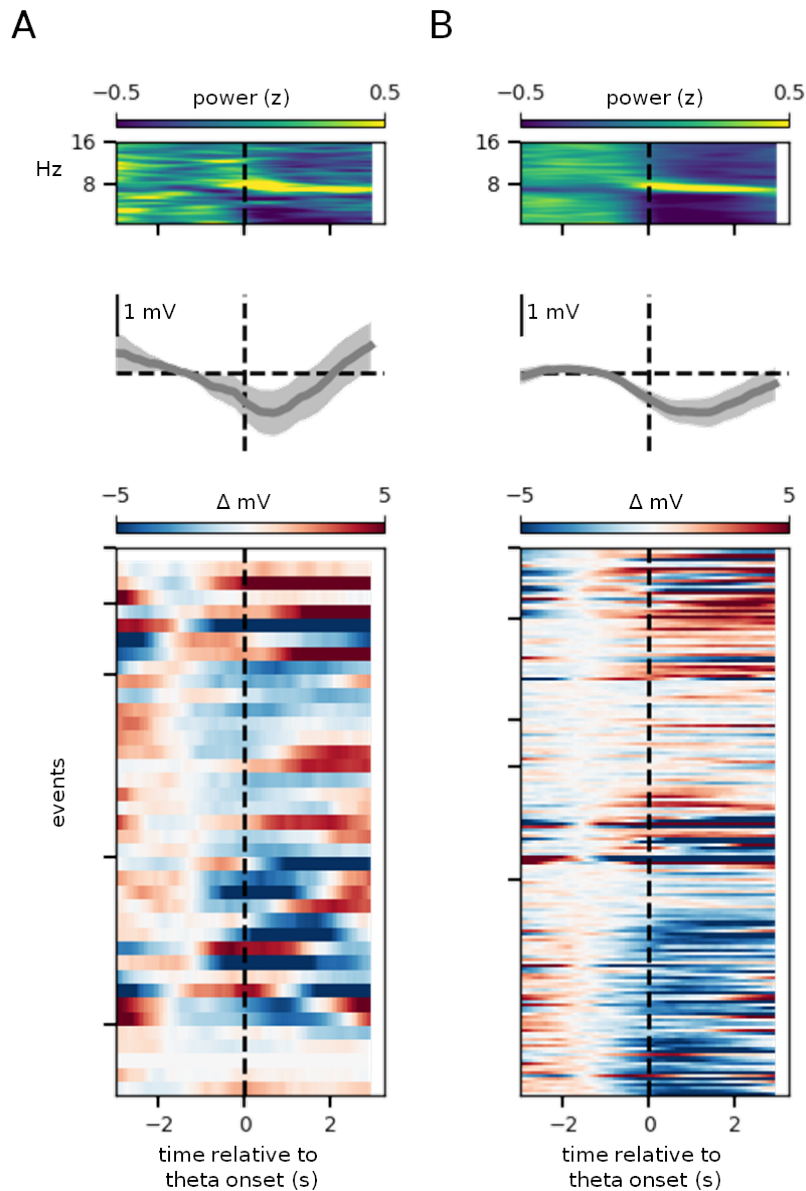


Fig. 5.1.: Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur le potentiel de membrane de cellules pyramidales de CA3 lors d'oscillations theta. (A) Changements du potentiel de membrane avant application d'antagonistes cholinergiques. Haut : Spectrogramme du LFP centré à la transition au rythme theta. Milieu : Moyenne du potentiel de membrane des CP de CA3 ($n = 4$) lors de transitions au rythme theta. Bas : Modulation du Vm des CP de CA3 lors des transitions au rythme theta. (B) Changements du potentiel de membrane après application d'antagonistes cholinergiques. Haut, Milieu et Bas similaires à (A).

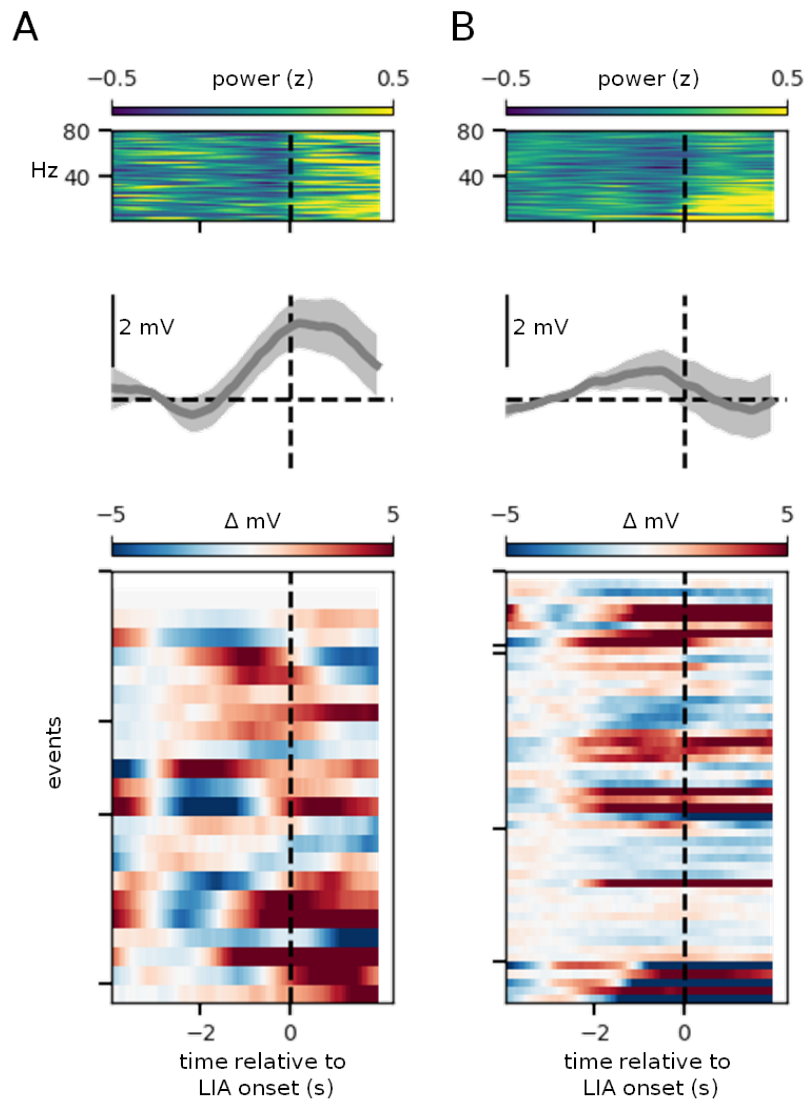


Fig. 5.2.: Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur le potentiel de membrane de cellules pyramidales de CA3 lors de périodes de LIA. (A) Changements du potentiel de membrane avant application d'antagonistes cholinergiques. Haut : Spectrogramme du LFP centré à la transition à la LIA. Milieu : Moyenne du potentiel de membrane des CP de CA3 lors de transitions à la LIA. Bas : Modulation du Vm des CP de CA3 lors des transitions à la LIA. (B) Changements du potentiel de membrane après application d'antagonistes cholinergiques. Haut, Milieu et Bas similaires à (A).

En revanche, lorsque l'on compare les changements moyens du potentiel de membrane des cellules lors de périodes de rythme theta et LIA avant et après l'application d'antagonistes, une tendance se dégage et il semblerait que quelle que soit la direction de la modulation avant inhibition cholinergique (dépolérisation ou hyperpolarisation), l'amplitude de cette modulation tend à diminuer après inhibition cholinergique, que ce soit lors d'oscillations theta ou LIA (Fig. 5.3).

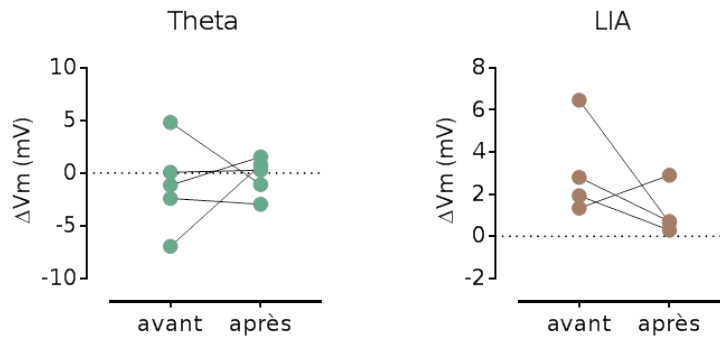


Fig. 5.3.: Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur la modulation du potentiel de membrane des CP de CA3 lors de périodes de theta et de LIA. Panel de gauche : Changement moyen du potentiel de membrane des CP de CA3 lors des périodes de rythme theta avant et après application d'antagonistes cholinergique. Chaque point représente un neurone. Panel de droite : identique au panel de gauche mais pour les périodes de LIA

Comme mentionné précédemment, le nombre de CP enregistrées étant trop faible pour réaliser une étude statistique, les données présentées ci-dessus sont à interpréter prudemment. Cependant, elles sont suffisantes pour estimer qu'il est nécessaire de compléter l'ensemble de données, car il semblerait que l'application d'antagonistes cholinergiques ait un impact sur l'activité intracellulaire des CP de CA3 chez l'animal éveillé.

5.2 Localisation et caractérisation morphologique des CP de CA3

Dans l'hippocampe, des populations cellulaires longtemps considérées comme homogènes semblent en fait être composées de sous-groupes de cellules différentes aux propriétés structurales et fonctionnelles distinctes. C'est le cas de CA3, où l'arborisation dendritique, les projections axonales, et l'expression des gènes ont été caractérisés et démontrés comme différents selon un gradient proximo-distal (Ishizuka et al. 1995, Ishizuka et al. 1990, Li et al. 1994, Thompson et al. 2008). En effet, CA3 peut être divisé en 3 sous-régions : CA3c, le plus proximal, se trouve proche du GD, alors que CA3a se trouve proche de CA2, et CA3b entre CA3a et CA3c. Des différences entre ces régions se traduisent par un gradient proximodistal d'excitabilité intrinsèque des CP, provenant d'une différence dans la résistance d'entrée des cellules due à un gradient de la quantité de canaux HCN ainsi que de leur surface membranaire (Turner et al. 1995, Sun et al. 2017). De plus, il existe une hétérogénéité des réponses post-synaptiques le long de l'axe proximodistal concernant les 3 entrées majeures de CA3, via les fm, le CE, et CA3 lui-même. L'excitation provenant des fm diminue le long de cet axe, et celle provenant du CE augmente (Sun et al. 2017), en accord avec la connectivité anatomique du réseau (Ishizuka et al. 1995, Claiborne et al. 1986). CA3a et CA3b recevraient également plus de projections provenant des

connexions récurrentes de CA3 que CA3c.

Récemment, deux types de CP de CA3 ont été identifiées et diffèrent dans leur morphologie, physiologie, et propriétés synaptiques (Hunt et al. 2018). En plus des CP "classiques" précédemment décrites, une autre classe de CP se situerait dans la couche profonde du *stratum pyramidale* de CA3a et CA3b, et une de leur principale caractéristique réside dans l'absence d'excroissances épineuses, post-synapses des contacts provenant des fm. Cette population ne constituerait que 10 à 20% des CP de CA3. Ces cellules ne reçoivent peu ou pas d'informations du GD. Ces deux types de CP joueraient des rôles différents dans l'initiation des SWR (Hunt et al. 2018).

D'un point de vue comportemental, des lésions du CA3 proximal entraînent un déficit plus important du traitement d'informations spatiales que des lésions du CA3 plus distal (Hunsaker et al. 2008). De plus, le CA3 distal serait impliqué de manière plus importante dans les processus de complétion de pattern (recevant plus d'informations du CE et de CA3 que des fm), et le CA3 proximal dans les processus de séparation de pattern (recevant plus d'informations des fm) (Lee et al. 2015, Lu et al. 2015).

Les données présentées dans ce mémoire ont été obtenues dans l'hippocampe dorsal, et proviennent en grande partie de CA3c et CA3b. Cependant, il serait important de caractériser systématiquement la morphologie des neurones enregistrés pour pouvoir comparer ces données avec les données disponibles dans la littérature concernant l'hétérogénéité des CP de CA3. On peut émettre l'hypothèse que les différentes modulations intracellulaires des CP de CA3 lors de différents états cérébraux proviennent de CP ayant des caractéristiques morphologiques différentes ou bien situées dans différentes sous-région de CA3. Même si de la biocytine est introduite dans la pipette d'enregistrement, il est souvent difficile de reconstituer totalement la cellule enregistrée, et cela pour plusieurs raisons : la biocytine n'a peut-être pas eu le temps de diffuser dans l'intégralité du neurone, le neurone est resté endommagé à la suite de l'enregistrement et est mort ou a perdu la biocytine qui y était présente, ou bien la biocytine a diffusé dans de nombreux neurones lors de l'application de pression positive avant les enregistrements, rendant difficile l'identification certaine du neurone enregistré pendant l'expérience. Cette difficulté combinée à la difficulté inhérente à la technique de patch-clamp *in vivo* rend difficile la caractérisation morphologique et anatomique systématique des neurones enregistrés. Il faudrait donc collecter un plus grand nombre de données pour pouvoir répondre à cette problématique, qui reste cependant d'un intérêt important et constitue donc une perspective intéressante pour la poursuite de cette étude.

5.3 Rôle des entrées du gyrus denté

Les différentes informations reçues par les CP de CA3 lors des différents états cérébraux pourraient influencer leur activité et la direction de leur modulation pendant ces états. Pour pouvoir étudier l'importance de ces informations, nous avons mis en place une stratégie d'inhibition du gyrus denté à l'aide du système DREADD (pour Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs). Ces systèmes sont des constructions moléculaires basées sur des récepteurs à

protéine G et créées de façon à n'être sensibles qu'à une molécule ligand qui n'est pas présente naturellement dans l'organisme. Cela permet de contrôler temporellement et spatialement leur activation en injectant le ligand de synthèse, typiquement une N-oxide clozapine (CNO). Ici, la protéine G du récepteur est de type Gi, et entraînera donc l'inhibition des neurones lorsqu'elle sera activée par le CNO. En injectant un virus qui permet l'expression de ce récepteur, fusionné à une protéine rapporteur (mCherry), dans le GD, il est possible de contenir l'expression du virus uniquement dans cette structure. Nous avons réalisé une étude pilote permettant de valider l'expression du virus et son efficacité *in vitro* sur des sections d'hippocampes de souris (Fig. 5.4).

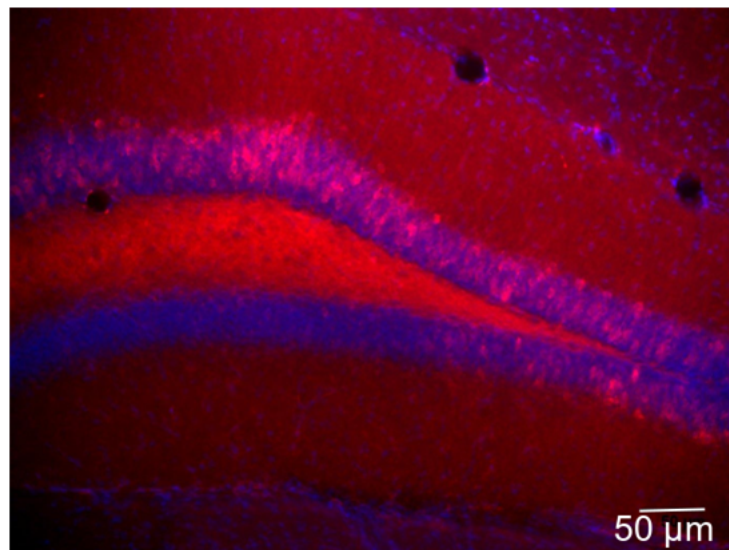


Fig. 5.4.: Expression du virus AAV-CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry dans le gyrus denté.

En effectuant des enregistrements *in vivo* chez l'animal éveillé, nous pourrions donc étudier l'impact de l'inhibition des cellules du GD sur l'activité des CP de CA3. Etant donné que certaines CP caractérisées récemment ne reçoivent peu ou pas d'information provenant des fm (Hunt et al. 2018), nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition du GD aura un impact différent selon la CP enregistrée et son innervation par les fm.

CONCLUSION

Conclusion

Au cours de ma thèse j'ai mis au point la technique d'enregistrements électrophysiologiques chez la souris éveillée au sein du laboratoire. L'utilisation de cette technique est nécessaire pour l'étude des dynamiques intracellulaires des CP de CA3 *in vivo* lors de différents états cérébraux et comportementaux. Cette étude a permis de mettre en évidence les différentes modulations intracellulaires ayant lieu lors des transitions aux rythmes theta et à la LIA. Ces deux rythmes sont caractéristiques du LFP hippocampique et correspondent à des états d'éveil opposés. Les données suggèrent que chaque rythme joue un rôle spécifique dans l'encodage de la mémoire. CA3 est nécessaire à l'encodage, la consolidation et le rappel de la mémoire épisodique. Nos données montrent qu'une forte proportion des CP de CA3 est susceptible à la modulation intracellulaire pendant les changements d'état cérébral. Pendant le rythme theta, la plupart des CP de CA3 sont hyperpolarisés, diminuent leur fréquence de décharge et ont un potentiel de membrane à la variance plus faible que pendant la LIA. Nos résultats démontrent un rôle spécifique pour les CP de CA3 pendant le rythme theta par rapport aux cellules de CA1 et du GD. Pendant les périodes d'éveil élevé comme le rythme theta, une sous-population des CP de CA3 est sélectivement activée alors qu'une majorité des autres CP est hyperpolarisée et silencieuse. Cette modulation au niveau cellulaire pourrait jouer un rôle dans l'émergence des oscillations, et permettre à CA3 d'effectuer différentes fonctions mnésiques lors d'états cérébraux différents.

D'une manière générale, les états cérébraux et comportementaux des animaux sont sujets à des changements constants et rapides. Ces variations contribuent à la variabilité apparente des réponses sensorielles, au niveau neuronal et comportemental. Il est important de prendre en compte ces changements d'états lors d'études chez l'animal éveillé, car différents états d'éveil sont corrélés avec différentes performances d'encodage d'information et comportementale. Les changements d'état d'éveil entraînent une modification de l'intégration sensorielle des neurones corticaux. Les fluctuations entre les états cérébraux ont un impact sur le signal (i.e. l'activité des neurones par les potentiels d'action) et le bruit synaptique dans les neurones. Prendre en compte ces fluctuations permet de réduire la variabilité des réponses des neurones, et d'en déduire le fonctionnement des réseaux en fonction des états de l'animal de manière précise. De futures études permettront d'étudier le rôle des modulations intracellulaires observées dans l'hippocampe lors de différents états cérébraux dans le contexte de l'encodage de la mémoire.

Références

- Abrahams, S., R. G. Morris, C. E. Polkey, et al. 1999. „Hippocampal involvement in spatial and working memory: A structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis.“ *Brain and Cognition* 41 (1): 39–65. (Cited on page 19).
- Acsady, Laszlo, Anita Kamondi, Attila Sik, Tamás F. Freund, and György Buzsáki. 1998. „GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus.“ 18 (9): 3386–3403. (Cited on page 10).
- Albuquerque, E. X., E F Pereira, M. Alkondon, A. Schrattenholz, and A. Maelicke. 1997. „Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity.“ *Journal of receptor and signal transduction research* 17 (1-3): 243–66. (Cited on page 109).
- Alkondon, Manickavasagam, and Edson X Albuquerque. 2001. „Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus.“ *Journal of neurophysiology* 86 (6): 3043–55. (Cited on page 109).
- Amaral, D. G., R. Insausti, and W. M. Cowan. 1984. „The commissural connections of the monkey hippocampal formation.“ *Journal of Comparative Neurology* 224 (3): 307–336. (Cited on page 19).
- Amaral, David G., and Judith A. Dent. 1981. „Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions.“ *The Journal of Comparative Neurology* 195 (1): 51–86. (Cited on page 10).
- Amaral, David G., Norio Ishizuka, and Brenda Claiborne. 1990. „Chapter Neurons, numbers and the hippocampal network.“ *Progress in Brain Research* 83 (C): 1–11. (Cited on page 5).
- Andersen, P, E Moser, M B Moser, and M Trommald. 1996. „Cellular correlates to spatial learning in the rat hippocampus.“ *J Physiology Paris* 90 (5-6): 349. (Cited on page 17).
- Andersen, P., H. B. Bland, T. Myhrer, and P. A. Schwartzkroin. 1979. „Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production.“ *Brain Research* 165 (1): 13–22. (Cited on page 31).
- Andersen, Per, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss, and John O’ Keefe. 2009. *The Hippocampus Book*, 1–852. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on pages 4, 18, 19).
- Armstrong, Clay M., and William F. Gilly. 1992. „Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping.“ *Methods in Enzymology* 207 (C): 100–122. (Cited on pages 53, 54).
- Assaf, S. Y., and J. J. Miller. 1978. „The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization.“ *Neuroscience* 3 (6): 539–550. (Cited on page 32).

- Aston-Jones, Gary, and Jonathan D. Cohen. 2005. „Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance.“ *Journal of Comparative Neurology* 493 (1): 99–110. (Cited on page 109).
- Atallah, Bassam V, and Massimo Scanziani. 2009. „Instantaneous modulation of gamma oscillation frequency by balancing excitation with inhibition.“ *Neuron* 62 (4): 566–77. (Cited on page 55).
- Bakker, Arnold, C. Brock Kirwan, Michael Miller, and Craig E.L. Stark. 2008. „Pattern Separation in the Human.“ *Science* 319 (March): 1640–1642. (Cited on page 27).
- Barnes, Carol, and B L McNaughton. 1990. „Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing.“ *Progress in Brain Research* 83. (Cited on page 22).
- Bartos, M., I. Vida, M. Frotscher, et al. 2002. „Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (20): 13222–13227. (Cited on page 9).
- Bazelot, Michaël, Maria T. Teleńczuk, and Richard Miles. 2016. „Single CA3 pyramidal cells trigger sharp waves in vitro by exciting interneurons.“ *Journal of Physiology* 594 (10): 2565–2577. (Cited on pages 9, 66).
- Bazelot, Michaël, Céline Dinocourt, Ivan Cohen, and Richard Miles. 2010. „Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus.“ *Journal of Physiology* 588 (12): 2077–2090. (Cited on pages 9, 66).
- Bédard, Claude, and Alain Destexhe. 2014. „Local field potentials.“ In *Handbook of Neural Activity Measurement*, edited by Romain Brette and Alain Destexhe, 136–191. Cambridge: Cambridge University Press. (Cited on page 48).
- Bédard, Claude, Sebastien Béhuret, Charlotte Deleuze, Thierry Bal, and Alain Destexhe. 2012. „Oversampling method to extract excitatory and inhibitory conductances from single-trial membrane potential recordings.“ *Journal of Neuroscience Methods* 210 (1): 3–14. (Cited on page 106).
- Berg, R. W. 2003. „Vibrissa Movement Elicited by Rhythmic Electrical Microstimulation to Motor Cortex in the Aroused Rat Mimics Exploratory Whisking.“ *Journal of Neurophysiology* 90 (5): 2950–2963. (Cited on page 34).
- Berg, R. W., D. Whitmer, and D. Kleinfeld. 2006. „Exploratory Whisking by Rat Is Not Phase Locked to the Hippocampal Theta Rhythm.“ *Journal of Neuroscience* 26 (24): 6518–6522. (Cited on page 34).
- Best, Phillip J., and James B. Ranck. 1982. „Reliability of the relationship between hippocampal unit activity and sensory-behavioral events in the rat.“ *Experimental Neurology* 75 (3): 652–664. (Cited on page 21).
- Beyeler, Anna, Aude Retailleau, Colin Molter, et al. 2013. „Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity In Vitro.“ *PLoS ONE* 8 (6). (Cited on page 9).
- Bischofberger, Josef, Dominique Engel, Michael Frotscher, and Peter Jonas. 2006. „Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network.“ *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 453 (3): 361–372. (Cited on page 13).
- Bittner, Katie C, Christine Grienberger, Sachin P Vaidya, et al. 2015. „Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons.“ *Nature neuroscience* 18 (8): 1133–42. (Cited on pages 40, 55).
- Blackstad, Theodor W., and Åsmund Kjaerheim. 1961. „Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: Electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers.“ *Journal of Comparative Neurology* 117 (2): 133–159. (Cited on page 5).

- Bland, Brian H., Scott D. Oddie, Luis V. Colom, and Robert P. Vertes. 1994. „Extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway.“ *Hippocampus* 4 (6): 649–660. (Cited on page 32).
- Bland, Brian H., Luis V. Colom, and Richard D. Ford. 1990. „Responses of septal θ -on and θ -off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region.“ *Brain Research Bulletin* 24 (1): 71–79. (Cited on page 32).
- Bocian, Renata, and Jan Konopacki. 2004. „The effect of posterior hypothalamic injection of cholinergic agents on hippocampal formation theta in freely moving cat.“ *Brain Research Bulletin* 63 (4): 283–294. (Cited on page 32).
- Bragin, A, G Jandó, Z Nádasdy, et al. 1995. „Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (1 Pt 1): 47–60. (Cited on pages 30, 35).
- Brennecke, R., and B. Lindemann. 1971. „A chopped-current clamp for current injection and recording of membrane polarization with single electrodes of changing resistance.“ (Cited on page 51).
- Brette, Romain, and Alain Destexhe. 2012. „Intracellular recording.“ In *Handbook of Neural Activity Measurement*, edited by Romain Brette and Alain Destexhe, 5:44–91. 8. Cambridge: Cambridge University Press. (Cited on pages 40, 52).
- Brock, L. G., J. S. Coombs, and J. C. Eccles. 1952. „The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode.“ *The Journal of Physiology* 117 (4): 431–460. (Cited on page 50).
- Brun, Vegard, Mona Ottersen, Sturla Molden, et al. 2002. „Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry.“ *Science* 296 (June): 2243–2246. (Cited on page 21).
- Bruton, C.J. 1988. *The Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy*. Maudsley monographs. Oxford University Press. (Cited on page 44).
- Bullock, T. H., G. Buzsáki, and M. C. McClune. 1990. „Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus in freely-moving rats.“ *Neuroscience* 38 (3): 609–619. (Cited on page 34).
- Bunsey, Michael, and Howard Eichenbaum. 1995. „Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association.“ *Hippocampus* 5 (6): 546–556. (Cited on page 24).
- Buzsáki, G. 1986. „Hippocampal sharp waves: their origin and significance.“ *Brain research* 398 (2): 242–252. (Cited on pages 36, 37, 42).
- Buzsáki, G., J. Wiesner, S. J. Henriksen, and F. H. Gage. 1989. „Long-term potentiation of evoked and spontaneous neuronal activity in the grafted hippocampus.“ *Experimental Brain Research* 76 (2): 401–408. (Cited on pages 36, 37).
- Buzsáki, György. 2015. „Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning.“ *Hippocampus* 25 (10): 1073–1188. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on page 104).
- Buzsáki, György. 2002. „Theta oscillations in the hippocampus.“ *Neuron* 33 (3): 325–340. (Cited on page 30).
- Buzsáki, György, and Edvard I. Moser. 2013. „Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system.“ *Nature Neuroscience* 16 (2): 130–138. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 104).
- Buzsáki, György, Leung Lai-Wo S., and Cornelius H. Vanderwolf. 1983. „Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat.“ *Brain Research Reviews* 6 (2): 139–171. (Cited on pages 30, 35, 37).

- Buzsáki, György, Z Horváth, R Urioste, J Hetke, and K Wise. 1992. „High-frequency network oscillation in the hippocampus.“ *Science (New York, N.Y.)* 256 (5059): 1025–1027. (Cited on pages 30, 37).
- Buzsáki, György, Costas a Anastassiou, and Christof Koch. 2012. „The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes.“ *Nature reviews. Neuroscience* 13 (6): 407–20. (Cited on page 29).
- Canolty, R T, E Edwards, S S Dalal, et al. 2006. „High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex.“ *Science (New York, N.Y.)* 313 (5793): 1626–8. (Cited on page 35).
- Carr, Margaret F., Shantanu P. Jadhav, and Loren M. Frank. 2011. „Hippocampal replay in the awake state: A potential substrate for memory consolidation and retrieval.“ *Nature Neuroscience* 14 (2): 147–153. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 36).
- Castillo, P E, R C Malenka, and R a Nicoll. 1997. „Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons.“ *Nature* 1997/07/10 (6638): 182–186. (Cited on page 11).
- Chamberland, S., A. Evstratova, and K. Toth. 2014. „Interplay between Synchronization of Multivesicular Release and Recruitment of Additional Release Sites Support Short-Term Facilitation at Hippocampal Mossy Fiber to CA3 Pyramidal Cells Synapses.“ *Journal of Neuroscience* 34 (33): 11032–11047. (Cited on page 12).
- Chapman, C A, and J C Lacaille. 1999. „Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (19): 8637–45. (Cited on page 109).
- Chicurel M E, Harris K M . 1992. „Three-Dimensional Analysis of the Structure and Composition of CA3 Branched Dendritic Spines and their Synaptic Relationships with Mossy Fiber Boutons in the rat hippocampus.“ *J. Comp Neurol.* 325:1992. (Cited on pages 10, 11).
- Claiborne, B J, D G Amaral, and W M Cowan. 1986. „A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus.“ *The Journal of comparative neurology* 246 (4): 435–458. (Cited on page 113).
- Cole, K.S. 1949. „Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane.“ *Annu Rev Physiol*, no. 3: 253–258. (Cited on page 51).
- Colgin, Laura Lee. 2013. „Mechanisms and Functions of Theta Rhythms.“ *Annual Review of Neuroscience* 36 (1): 295–312. (Cited on pages 34, 63).
- Colgin, Laura Lee. 2016. „Rhythms of the hippocampal network.“ *Nature Reviews Neuroscience* 17 (4): 239–249. (Cited on page 48).
- Colgin, Laura Lee, Tobias Denninger, Marianne Fyhn, et al. 2009. „Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus.“ *Nature* 462 (7271): 353–357. arXiv: arXiv:1507.02142v2. (Cited on pages 35, 36).
- Collingridge, G. L., S. J. Kehl, and H. McLennan. 1983. „Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral commissural pathway of the rat hippocampus.“ *The Journal of Physiology* 334 (1): 33–46. (Cited on page 17).
- Cope, D. W., G. Maccaferri, L. F. MÁrton, et al. 2002. „Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus.“ *Neuroscience* 109 (1): 63–80. (Cited on page 17).
- Corkin, Suzanne. 1984. *Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M.* (Cited on page 24).

- Crochet, Sylvain, and C. C H Petersen. 2006. „Correlating whisker behavior with membrane potential in barrel cortex of awake mice.“ *Nature Neuroscience* 9 (5): 608–610. (Cited on page 104).
- Csicsvari, J, H Hirase, a Mamiya, and G Buzsáki. 2000. „Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events.“ *Neuron* 28 (2): 585–594. (Cited on pages 9, 37, 66).
- Csicsvari, Jozsef, Brian Jamieson, Kensall D. Wise, and György Buzsáki. 2003. „Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat.“ *Neuron* 37 (2): 311–322. (Cited on pages 9, 66).
- Curtsuridis, Vassilis, Bruce Graham, Stuart Cobb, and Imre Vida. 2012. *Hippocampal Microcircuits: A Computational Modeler S Resource Book*, 8:25–42. 8. (Cited on page 4).
- Daumas, Stephanie, Johnatan Ceccom, Helene Halley, Bernard Frances, and Jean-Michel Lassalle. 2009. „Activation of metabotropic glutamate receptor type 2 / 3 supports the involvement of the hippocampal mossy fiber pathway on contextual fear memory consolidation.“ *Learning & Memory*: 504–507. (Cited on page 28).
- Debanne, D, B H Gähwiler, and S M Thompson. 1998. „Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures.“ *The Journal of physiology* 507 (Pt 1):237–47. (Cited on page 15).
- Debanne, Dominique, Sami Boudkkazi, Emilie Campanac, et al. 2008. „Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices.“ *Nature protocols* 3 (10): 1559–1568. (Cited on page 15).
- Deguchi, Yuichi, Flavio Donato, Ivan Galimberti, Erik Cabuy, and Pico Caroni. 2011. „Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus.“ *Nature Neuroscience* 14 (4): 495–504. (Cited on page 14).
- Demeter, Steven, Douglas L. Rosene, and Gary W. van Hoesen. 1985. „Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: The structure and organization of the hippocampal commissures.“ *Journal of Comparative Neurology* 233 (1): 30–47. (Cited on page 19).
- Dickson, C T, J Magistretti, M Shalinsky, B Hamam, and A Alonso. 2000. „Oscillatory activity in entorhinal neurons and circuits. Mechanisms and function.“ *Annals of the New York Academy of Sciences* 911 (1): 127–50. (Cited on page 31).
- Donato, Flavio, Santiago Belluco Rompani, and Pico Caroni. 2013. „Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning.“ *Nature* 504 (7479): 272–6. (Cited on pages 7, 28).
- Dudek, S M, and M F Bear. 1992. „Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10): 4363–7. (Cited on page 17).
- Dugladze, Tamar, Dietmar Schmitz, Miles A Whittington, Imre Vida, and Tengis Gloveli. 2012. „Segregation of Axonal and Somatic Activity During Fast Network Oscillations.“ *Science* 336 (June): 1458–1461. (Cited on page 9).
- Duque, Alvaro, and Laszlo Zaborszky. 2006. „Juxtacellular labeling of individual neurons in vivo: From electrophysiology to synaptology.“ In *Neuroanatomical Tract-Tracing 3: Molecules, Neurons, and Systems*, 197–236. Springer US. (Cited on page 39).

- Eggermann, Emmanuel, Yves Kremer, Sylvain Crochet, and Carl C H Petersen. 2014. „Cholinergic Signals in Mouse Barrel Cortex during Active Whisker Sensing.“ *Cell Reports* 9 (5): 1654–1661. (Cited on page 110).
- Ego-Stengel, Valérie, and Matthew A. Wilson. 2010. „Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat.“ *Hippocampus* 20 (1): 1–10. (Cited on page 37).
- Eichenbaum, H. 2001. „The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes.“ *Behav Brain Res* 127 (1-2): 199–207. (Cited on page 19).
- Eichenbaum, Howard. 2000. „A cortical–hippocampal system for declarative memory.“ *Nature Reviews Neuroscience* 1 (1): 41–50. (Cited on page 24).
- Einstein, Michael C., Pierre-Olivier Polack, Duy T. Tran, and Peyman Golshani. 2017. „Visually Evoked 3–5 Hz Membrane Potential Oscillations Reduce the Responsiveness of Visual Cortex Neurons in Awake Behaving Mice.“ *The Journal of Neuroscience* 37 (20): 5084–5098. (Cited on page 56).
- Engert, Florian, and Tobias Bonhoeffer. 1999. „Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity.“ *Nature* 399 (6731): 66–70. (Cited on page 14).
- English, Daniel F, Adrien Peyrache, Eran Stark, et al. 2014. „Excitation and Inhibition Compete to Control Spiking during Hippocampal Ripples: Intracellular Study in Behaving Mice.“ *J Neurosci* 34 (49): 16509–16517. (Cited on pages 42, 43).
- Epsztein, J., A. K. Lee, E. Chorev, and M. Brecht. 2010. „Impact of Spikelets on Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Activity During Spatial Exploration.“ *Science* 327 (5964): 474–477. (Cited on page 55).
- Epsztein, Jérôme, Michael Brecht, and Albert K. Lee. 2011. „Intracellular Determinants of Hippocampal CA1 Place and Silent Cell Activity in a Novel Environment.“ *Neuron* 70 (1): 109–120. (Cited on pages 40, 55).
- Fedele, Denise E., Nicolette Gouder, Martin Güttinger, et al. 2005. „Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation.“ *Brain* 128 (10): 2383–2395. (Cited on page 13).
- Fernandes, H. B., S. Riordan, T. Nomura, et al. 2015. „Epac2 Mediates cAMP-Dependent Potentiation of Neurotransmission in the Hippocampus.“ *Journal of Neuroscience* 35 (16): 6544–6553. (Cited on page 13).
- Foster, David J., and Matthew A. Wilson. 2006. „Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state.“ *Nature* 440 (7084): 680–683. arXiv: 440:680–683. (Cited on page 104).
- Fox, S. E., S. Wolfson, and J. B. Ranck. 1986. „Hippocampal theta rhythm and the firing of neurons in walking and urethane anesthetized rats.“ *Experimental Brain Research* 62 (3): 495–508. (Cited on pages 34, 41).
- Freund, T.F., and G. Buzsáki. 1998. „Interneurons of the hippocampus.“ *Hippocampus* 6 (4): 347–470. (Cited on page 8).
- Frisk, Virginia, and Brenda Milner. 1990. „The role of the left hippocampal region in the acquisition and retention of story content.“ *Neuropsychologia* 28 (4): 349–359. (Cited on page 20).
- Fuhrmann, Falko, Daniel Justus, Liudmila Sosulina, et al. 2015. „Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit.“ *Neuron* 86 (5): 1253–1264. (Cited on page 67).
- Fuhs, M. C. 2006. „A Spin Glass Model of Path Integration in Rat Medial Entorhinal Cortex.“ *Journal of Neuroscience* 26 (16): 4266–4276. (Cited on page 22).

- Fyhn, M. 2004. „Spatial Representation in the Entorhinal Cortex.“ *Science* 305 (5688): 1258–1264. (Cited on page 22).
- Galimberti, Ivan, Nadine Gogolla, Stefano Alberi, et al. 2006. „Long-Term Rearrangements of Hippocampal Mossy Fiber Terminal Connectivity in the Adult Regulated by Experience.“ *Neuron* 50 (5): 749–763. (Cited on page 11).
- Ganguly, K., and D. Kleinfeld. 2004. „Goal-directed whisking increases phase-locking between vibrissa movement and electrical activity in primary sensory cortex in rat.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (33): 12348–12353. (Cited on page 34).
- Girardeau, Gabrielle, Karim Benchenane, Sidney I Wiener, György Buzsáki, and Michaël B Zugaro. 2009. „Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory.“ *Nature neuroscience* 12 (10): 1222–1223. (Cited on page 37).
- Goard, Michael, and Yang Dan. 2009. „Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes.“ *Nature Neuroscience* 12 (11): 1444–1449. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 109).
- Golgi, C. 1885. „SULLA FINA ANATOMIA DEGLI ORGANI CENTRALI DEL SISTEMA NERVOSO.“ *Riv. Sper. Freniat. Med. Leg. Alienazione Ment.* 11:72–123. (Cited on page 9).
- Gonzales, Roberto B., Cynthia J. DeLeon Galvan, Yolanda M. Rangel, and Brenda J. Claiborne. 2001. „Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus.“ *The Journal of Comparative Neurology* 430 (3): 357–368. (Cited on page 5).
- Goutagny, Romain, Jesse Jackson, and Sylvain Williams. 2009. „Self-generated theta oscillations in the hippocampus.“ *Nature Neuroscience* 12 (12): 1491–1493. (Cited on page 34).
- Gray, Jeffrey A. 1971. „Medial septal lesions, hippocampal theta rhythm and the control of vibrissal movement in the freely moving rat.“ *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 30 (3): 189–197. (Cited on page 32).
- Green, J D, and A A Arduini. 1954. „Hippocampal electrical activity in arousal.“ *Journal of neurophysiology* 17 (6): 533–57. (Cited on pages 31, 67).
- Griffiths, D P. 1999. „Episodic memory: what can animals remember about the past?“ *Trends in Cognitive Science* 3 (February): 74–80. (Cited on page 23).
- Guzman, Segundo J., Alois Schlögl, Michael Frotscher, and Peter Jonas. 2016. „Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network.“ *Science*. (Cited on pages 14, 28).
- Guzowski, John F., James J. Knierim, and Edvard I. Moser. 2004. „Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1.“ *Neuron* 44 (4): 581–584. (Cited on pages 25, 27).
- Hafting, Torkel, Marianne Fyhn, Sturla Molden, May Britt Moser, and Edvard I. Moser. 2005. „Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex.“ *Nature* 436 (7052): 801–806. (Cited on pages 22, 56).
- Hagena, Hardy, and Denise Manahan-Vaughan. 2011. „Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing.“ *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 21 (11): 2442–9. (Cited on page 28).
- Hajos, N., Janos Palhalmi, Edward O Mann, et al. 2004. „Spike Timing of Distinct Types of GABAergic Interneuron during Hippocampal Gamma Oscillations In Vitro.“ *Journal of Neuroscience* 24 (41): 9127–9137. (Cited on page 66).
- Hallermann, S., C. Pawlu, P. Jonas, and M. Heckmann. 2003. „A large pool of releasable vesicles in a cortical glutamatergic synapse.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (15): 8975–8980. (Cited on page 12).

- Hangya, B., Z. Borhegyi, N. Szilagy, T. F. Freund, and V. Varga. 2009. „GABAergic Neurons of the Medial Septum Lead the Hippocampal Network during Theta Activity.“ *Journal of Neuroscience* 29 (25): 8094–8102. (Cited on page 31).
- Harris, Kenneth D., Peter Bartho, Paul Chadderton, et al. 2011. „How do neurons work together? Lessons from auditory cortex.“ *Hearing Research* 271 (1-2): 37–53. (Cited on page 40).
- Harvey, Christopher D., Forrest Collman, Daniel A. Dombeck, and David W. Tank. 2009. „Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation.“ *Nature* 461 (7266): 941–946. (Cited on pages 41, 42, 55).
- Hasselmo, Michael E. 1999. „Neuromodulation: Acetylcholine and memory consolidation.“ *Trends in Cognitive Sciences* 3 (9): 351–359. (Cited on page 40).
- Hasselmo, Michael E., and Bradley P. Wyble. 1997. „Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: Simulating effects of scopolamine on human memory function.“ *Behavioural Brain Research* 89 (1-2): 1–34. (Cited on page 25).
- Heinricher, Mary Magdalen. 2004. „2 Principles of Extracellular Single-Unit Recording.“ (Cited on page 50).
- Henze, D. A., and G. Buzsáki. 2001. „Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity.“ *Neuroscience* 105 (1): 121–130. eprint: /doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00167-1 (https:). (Cited on page 6).
- Henze, D. a., N. N. Urban, and G. Barrionuevo. 2000. „The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review.“ *Neuroscience* 98 (3): 407–427. (Cited on page 10).
- Henze, Darrell a, Lucia Wittner, and György Buzsáki. 2002. „Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo.“ *Nature neuroscience* 5 (8): 790–795. (Cited on pages 10, 11, 14).
- Herfst, Lucas, Andrea Burgalossi, Kurt Haskic, et al. 2012. „Friction-based stabilization of juxtacellular recordings in freely moving rats.“ *Journal of neurophysiology* 108 (2): 697–707. (Cited on page 39).
- Herrero, J. L., M. J. Roberts, L. S. Delicato, et al. 2008. „Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1.“ *Nature* 454 (7208): 1110–1114. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 109).
- Herzog, Etienne, Shigeo Takamori, Reinhard Jahn, Nils Brose, and Sonja M. Wojcik. 2006. „Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus.“ *Journal of Neurochemistry* 99 (3): 1011–1018. (Cited on page 14).
- Hessler, Neal A., Aneil M. Shirke, and Roberto Malinow. 1993. „The probability of transmitter release at a mammalian central synapse.“ *Nature* 366 (6455): 569–572. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on page 17).
- Hirano, T., P. Best, and J. Olds. 1970. „Units During Habituation, Discrimination Learning, and Extinction“: 127–135. (Cited on page 20).
- Hodgkin, A L, and A F Huxley. 1952. „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.“ *The Journal of physiology* 117 (4): 500–44. (Cited on page 51).
- Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1939. „Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre.“ *Nature* 144 (3651): 710–711. (Cited on page 50).
- Holahan, Matthew R, Jerome L Rekart, Jimena Sandoval, and Aryeh Routtenberg. 2006. „Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains.“ *Hippocampus* 16 (6): 560–70. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 28).

- Hölscher, C, R Anwyl, and M J Rowan. 1997. „Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (16): 6470–6477. (Cited on page 35).
- Horikawa, K, and W E Armstrong. 1988. „A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates.“ *Journal of Neuroscience Methods* 25 (1): 1–11. (Cited on page 59).
- Houweling, Arthur R., and Michael Brecht. 2008. „Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex.“ *Nature* 451 (7174): 65–68. (Cited on page 39).
- Hu, Hua, Koen Vervaeke, and Johan F. Storm. 2002. „Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells.“ *Journal of Physiology* 545 (3): 783–805. (Cited on page 31).
- Huerta, Patricio T., and John E. Lisman. 1995. „Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro.“ *Neuron* 15 (5): 1053–1063. (Cited on page 35).
- Hulse, Brad K., Evgeniy V. Lubenov, and Athanassios G. Siapas. 2017. „Brain State Dependence of Hippocampal Subthreshold Activity in Awake Mice.“ *Cell Reports* 18 (1): 136–147. arXiv: 15334406. (Cited on pages 38, 41–43, 56, 63, 67, 104, 105, 107).
- Hulse, Brad K, Laurent C Moreaux, Evgeniy V Lubenov, Athanassios G Siapas Correspondence, and Athanassios G Siapas. 2016. „Membrane Potential Dynamics of CA1 Pyramidal Neurons during Hippocampal Ripples in Awake Mice.“ *Neuron* 89 (4): 800–813. (Cited on pages 42, 56, 63).
- Hunsaker, Michael R., Graham G. Mooy, Jesse S. Swift, and Raymond P. Kesner. 2007. „Dissociations of the Medial and Lateral Perforant Path Projections Into Dorsal DG, CA3, and CA1 for Spatial and Nonspatial (Visual Object) Information Processing.“ *Behavioral Neuroscience* 121 (4): 742–750. (Cited on page 25).
- Hunsaker, Michael R., Jenna S. Rosenberg, and Raymond P. Kesner. 2008. „The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty.“ *Hippocampus* 18 (10): 1064–1073. (Cited on page 114).
- Hunt, David L, Daniele Linaro, Bailu Si, Sandro Romani, and Nelson Spruston. 2018. „A novel pyramidal cell type promotes sharp-wave synchronization in the hippocampus.“ *Nature Neuroscience*. (Cited on pages 105, 114, 115).
- Hyman, James M, Bradley P Wyble, Vikas Goyal, Christina A Rossi, and Michael E Hasselmo. 2003. „Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (37): 11725–31. (Cited on page 35).
- Ishizuka, N, W M Cowan, and D G Amaral. 1995. „A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus.“ *J Comp Neurol* 362 (April): 17–45. (Cited on page 113).
- Ishizuka, Norio, Janet Weber, and David G. Amaral. 1990. „Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat.“ *Journal of Comparative Neurology* 295 (4): 580–623. (Cited on pages 6, 14, 15, 18, 113).
- Ito, Hiroshi T., Edvard I. Moser, and May Britt Moser. 2018. „Supramammillary Nucleus Modulates Spike-Time Coordination in the Prefrontal-Thalamo-Hippocampal Circuit during Navigation.“ *Neuron* 99 (3): 576–587.e5. (Cited on page 32).

- Jarosiewicz, Beata, and William E. Skaggs. 2004. „Level of Arousal During the Small Irregular Activity State in the Rat Hippocampal EEG.“ *Journal of Neurophysiology* 91 (6): 2649–2657. (Cited on pages 38, 105).
- Jarosiewicz, Beata, Bruce L McNaughton, and William E Skaggs. 2002. „Hippocampal population activity during the small-amplitude irregular activity state in the rat.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (4): 1373–1384. (Cited on pages 38, 106).
- Jensen, Ole, and Laura L. Colgin. 2007. „Cross-frequency coupling between neuronal oscillations.“ *Trends in Cognitive Sciences* 11 (7): 267–269. (Cited on page 35).
- Jensen, Ole, and John E. Lisman. 2005. „Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer.“ *Trends in Neurosciences* 28 (2): 67–72. (Cited on page 35).
- Jerman, Taylor, Raymond P Kesner, and Michael R Hunsaker. 2006. „Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task“: 458–464. (Cited on page 27).
- Jonas, P., G Major, and B Sakmann. 1993. „Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus.“ *The Journal of Physiology* 472 (1): 615–663. (Cited on page 11).
- Jun, James J, Nicholas A Steinmetz, Joshua H Siegle, et al. 2017. „Fully Integrated Silicon Probes for High-Density Recording of Neural Activity.“ *Nature in press* (7679): 232–236. (Cited on page 49).
- Jung R, Konrmuller AE. 1938. „Eine Methodik der ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten.“ *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.* 109:1–30. (Cited on page 31).
- Jung, M W, and B L McNaughton. 1993. „Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer.“ *Hippocampus* 3 (2): 165–82. (Cited on page 21).
- Jung, MW, SI Wiener, and BL McNaughton. 1994. „Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat.“ *The Journal of Neuroscience* 14 (12): 7347–7356. (Cited on page 21).
- Kamiya, H, and S Ozawa. 1999. „Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse.“ *The Journal of physiology* 518 (Pt 2): 497–506. (Cited on page 13).
- Kamondi, a, L Acsády, and György Buzsáki. 1998a. „Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (10): 3919–3928. (Cited on page 42).
- Kamondi, Anita, Laszlo Acsady, Xiao-jing Wang, and György Buzsáki. 1998b. „Theta Oscillations in Somata and Dendrites of Hippocampal Pyramidal Cells In Vivo: Activity-Dependent Phase-Precession of Action Potentials.“ *Hippocampus* 261 (March): 244–261. (Cited on pages 7, 33, 40, 41).
- Kandel, E. R., W. A. Spencer, and F. J. Brinley. 1961. „ELECTROPHYSIOLOGY OF HIPPOCAMPAL NEURONS: I. SEQUENTIAL INVASION AND SYNAPTIC ORGANIZATION.“ *Journal of Neurophysiology* 24 (3): 225–242. (Cited on page 39).
- Katz, B, and A. L. Hodgkin. 1948. „The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.“ *J. Physiol* 108 (1): 37–77. (Cited on page 50).
- Kay, Kenneth, Marielena Sosa, Jason E. Chung, et al. 2016. „A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep.“ *Nature* 531 (7593): 185–90. (Cited on pages 38, 106).

- Kempermann, G, H G Kuhn, and F H Gage. 1997. „Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19): 10409–14. (Cited on page 11).
- Kesner, Raymond P. 2007. „Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus.“ *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 14 (11): 771–781. (Cited on page 28).
- Kesner, Raymond P., and Edmund T. Rolls. 2015. „A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments.“ *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 48:92–147. (Cited on pages 13, 66).
- Kirk, I. J., and N. McNaughton. 1993. „Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity.“ *Hippocampus* 3 (4): 517–525. (Cited on page 32).
- Kirk, Ian J., and Neil McNaughton. 1991. „Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity.“ *NeuroReport* 2 (11): 723–725. (Cited on page 32).
- Kjelstrup, Kirsten Brun, Trygve Solstad, Vegard Heimly Brun, et al. 2008. „Finite Scale of Spatial Representation in the Hippocampus.“ *Science* 321 (July): 140–143. (Cited on page 21).
- Klausberger, Thomas, Peter J Magill, László F. Márton, et al. 2003. „Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo.“ *Nature* 421 (6925): 844–848. (Cited on pages 6, 39, 109).
- Kobayashi, K, T Manabe, and T Takahashi. 1996. „Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber- CA3 synapse.“ *Science* 273 (5275): 648–650. (Cited on page 13).
- Kobayashi, Katsunori, Toshiya Manabe, and Tomoyuki Takahashi. 1999. „Calcium-dependent mechanisms involved in presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fibre– CA3 synapse.“ *Neuroscience* 11 (December 1998): 1633–1638. (Cited on page 13).
- Kowalski, Janina, Jian Gan, Peter Jonas, and Alejandro J. Pernía-Andrade. 2016. „Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern in vivo in anesthetized rats.“ *Hippocampus* 26 (5): 668–682. (Cited on pages 6, 55, 66).
- Kudrimoti, H S, C A Barnes, and B L McNaughton. 1999. „Reactivation of hippocampal cell assemblies: effects of behavioral state, experience, and EEG dynamics.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (10): 4090–4101. (Cited on page 37).
- Kukley, M. 2005. „The Role of Extracellular Adenosine in Regulating Mossy Fiber Synaptic Plasticity.“ *Journal of Neuroscience* 25 (11): 2832–2837. (Cited on page 13).
- Kuperstein, Michael, and Douglas A. Whittington. 1981. „A Practical 24 Channel Microelectrode for Neural Recording in Vivo.“ *IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME-28* (3): 288–293. (Cited on page 49).
- Kwon, Hyung-Bae Bae, and Pablo E. Castillo. 2008. „Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses.“ *Neuron* 60 (6): 1082–1094. (Cited on page 13).
- Lacy, Joyce W, Michael A Yassa, Shauna M Stark, L Tugan Muftuler, and Craig E L Stark. 2011. „Distinct pattern separation related transfer functions in human CA3 / dentate and CA1 revealed using high-resolution fMRI and variable mnemonic similarity.“ *Learning & Memory* 18 (Ward 2001): 15–18. (Cited on page 27).
- Lanore, Frédéric, Virginie F Labrousse, Zsolt Szabo, et al. 2012. „Deficits in morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses in a mouse model of intellectual disability.“ *The Journal of Neuroscience* 32 (49): 17882–93. (Cited on pages 11, 13).

- Larner, A. J., and M. Doran. 2006. „Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer’s disease associated with mutations of the presenilin-1 gene.“ *Journal of Neurology* 253 (2): 139–158. (Cited on page 45).
- Lassalle, J M, T Bataille, and H Halley. 2000. „Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task.“ *Neurobiology of learning and memory* 73 (3): 243–57. (Cited on page 28).
- Lawrence, J. Josh, and Chris J. McBain. 2003. „Interneuron Diversity series: Containing the detonation - Feedforward inhibition in the CA3 hippocampus.“ *Trends in Neurosciences* 26 (11): 631–640. (Cited on page 7).
- Lawrence, J Josh, Zachary M Grinspan, and Chris J McBain. 2004. „Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus.“ *The Journal of physiology* 554 (Pt 1): 175–93. (Cited on page 11).
- Lee, Albert K, Jérôme Epsztein, and Michael Brecht. 2009. „Head-anchored whole-cell recordings in freely moving rats.“ *Nature protocols* 4 (3): 385–392. (Cited on page 40).
- Lee, Albert K, Ian D Manns, Bert Sakmann, and Michael Brecht. 2006. „Whole-cell recordings in freely moving rats.“ *Neuron* 51 (4): 399–407. (Cited on page 40).
- Lee, Heekyung, Cheng Wang, SachinS. Deshmukh, and JamesJ. Knierim. 2015. „Neural Population Evidence of Functional Heterogeneity along the CA3 Transverse Axis: Pattern Completion versus Pattern Separation.“ *Neuron*: 1–13. (Cited on page 114).
- Lee, Inah, and Raymond P. Kesner. 2004. „Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus.“ *Hippocampus* 14 (1): 66–76. (Cited on page 27).
- Lee, Seung Hee, and Yang Dan. 2012. „Neuromodulation of Brain States.“ *Neuron* 76 (1): 109–222. (Cited on page 40).
- Leung, L. Stan. 1992. „Fast (beta) rhythms in the hippocampus: A review.“ *Hippocampus* 2 (2): 93–98. (Cited on pages 30, 35).
- Leung, Lai Wo S, and Chi Yiu Yim. 1986. „Intracellular records of theta rhythm in hippocampal CA1 cells of the rat.“ *Brain Research* 367 (1-2): 323–327. (Cited on page 41).
- Leung, Lai-Wo Stan, F.H.Lopes Da Silva, and W.J Wadman. 1982. „Spectral characteristics of the hippocampal EEG in the freely moving rat.“ *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 54 (2): 203–219. (Cited on page 30).
- Leutgeb, Jill K, Stefan Leutgeb, May-Britt Moser, and Edvard I Moser. 2007. „Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus.“ *Science (New York, N.Y.)* 315 (5814): 961–966. (Cited on pages 21, 27).
- Leutgeb, Stefan, Jill K Leutgeb, Alessandro Treves, May-Britt Moser, and Edvard I Moser. 2004. „Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1.“ *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688): 1295–8. (Cited on pages 22, 27).
- Levey, A I, S M Edmunds, V Koliatsos, R G Wiley, and C J Heilman. 1995. „Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (5 Pt 2): 4077–4092. (Cited on page 109).
- Li, W-C, S R Soffe, and Alan Roberts. 2004. „A direct comparison of whole cell patch and sharp electrodes by simultaneous recording from single spinal neurons in frog tadpoles.“ *Journal of neurophysiology* 92 (1): 380–6. (Cited on page 40).

- Li, X G, P Somogyi, a Ylinen, and G Buzsáki. 1994. „The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study.“ *The Journal of comparative neurology* 339 (2): 181–208. (Cited on pages 14, 18, 39, 113).
- Ling, G, and R W Gerard. 1949. „The normal membrane potential of frog sartorius fibers.“ *Journal of cellular and comparative physiology* 34 (3): 383–96. (Cited on page 51).
- Louie, Kenway, and Matthew A. Wilson. 2001. „Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep.“ *Neuron* 29 (1): 145–156. (Cited on page 34).
- Lu, Li, KeiM. Igarashi, MennoP. Witter, EdvardI. Moser, and May-Britt Moser. 2015. „Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus.“ *Neuron*: 1–15. (Cited on pages 21, 22, 114).
- Macadar, Angelica W., Leo M. Chalupa, and Donald B. Lindsley. 1974. „Differentiation of brain stem loci which affect hippocampal and neocortical electrical activity.“ *Experimental Neurology* 43 (3): 499–514. (Cited on page 32).
- Maccaferri, Gianmaria, and Chris J. McBain. 1996. „The hyperpolarization-activated current (I(h)) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons.“ *Journal of Physiology* 497 (1): 119–130. (Cited on page 31).
- Macrides, Foteos, Howard B Eichenbaum, and William B Forbes. 1982. „Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2 (12): 1705–17. (Cited on page 34).
- Maguire, E. A., R. S. J. Frackowiak, and C. D. Frith. 1996a. „Learning to Find your Way: A Role for the Human Hippocampal Formation.“ *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263 (1377): 1745–1750. (Cited on page 19).
- Maguire, Eleanor A., Neil Burgess, James G. Donnett, et al. 1998. „Knowing where and getting there.“ *Science* 280 (5365): 921–924. (Cited on page 19).
- Maguire, Eleanor a., Teresa Burke, Jack Phillips, and Hugh Staunton. 1996b. „Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans.“ *Neuropsychologia* 34 (10): 993–1001. (Cited on page 19).
- Maier, Nikolaus, Álvaro Tejero-Cantero, Anja L. Dorn, et al. 2011. „Coherent Phasic Excitation during Hippocampal Ripples.“ *Neuron* 72 (1): 137–152. (Cited on page 42).
- Marchetti, Marchetti, and Hélène Marie. 2011. „Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer’s disease: What have we learned so far from transgenic models?“ *Reviews in the Neurosciences* 22 (4): 373–402. (Cited on page 45).
- Marder, Eve. 2012. „Neuromodulation of Neuronal Circuits: Back to the Future.“ *Neuron* 76 (1): 1–11. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 40).
- Marder, Eve, Timothy O’Leary, and Sonal Shruti. 2014. „Neuromodulation of Circuits with Variable Parameters: Single Neurons and Small Circuits Reveal Principles of State-Dependent and Robust Neuromodulation.“ *Annual Review of Neuroscience* 37 (1): 329–346. (Cited on page 104).
- Margrie, Troy W., Michael Brecht, and Bert Sakmann. 2002. „In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain.“ *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 444 (4): 491–498. arXiv: z0024. (Cited on pages 40, 55, 57).
- Marmont, G. 1949. „Studies on the axon membrane; a new method.“ *Journal of cellular and comparative physiology* 34 (3): 351–82. (Cited on page 51).
- Marr, D. 1971. „Simple Memory: A Theory for Archicortex.“ *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 262 (841): 23–81. (Cited on page 24).

- Maru, Eiichi, Lorey K. Takahashi, and Shinkuro Iwahara. 1979. „Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat.“ *Brain Research* 163 (2): 223–234. (Cited on page 32).
- McBain, Chris J., and André Fisahn. 2001. „Interneurons unbound.“ *Nature Reviews Neuroscience* 2 (1): 11–23. (Cited on page 17).
- McClelland, James L., and Nigel H. Goddard. 1996. „Considerations arising from a complementary learning systems perspective on hippocampus and neocortex.“ *Hippocampus* 6 (6): 654–665. (Cited on page 25).
- McGinley, Matthew J., Martin Vinck, Jacob Reimer, et al. 2015. „Waking State: Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses.“ *Neuron* 87 (6): 1143–1161. arXiv: 15334406. (Cited on pages 68, 105, 107).
- McHugh, Thomas J., and Susumu Tonegawa. 2009. „CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation.“ *Hippocampus* 19 (12): 1153–1158. (Cited on page 28).
- McNaughton, B. L., and R. G M Morris. 1987a. „Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system.“ *Trends in Neurosciences* 10 (10): 408–415. (Cited on page 25).
- Mcnaughton, Bruce L, Carol A. Barnes, J. Meltzer, and R.J. Sutherland. 1989. „Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge.“ *Experimental Brain Research*: 319–326. (Cited on page 21).
- McNaughton, Bruce L., John O’Keefe, and Carol A. Barnes. 1983. „The stereotrode: A new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous system from multiple unit records.“ *Journal of Neuroscience Methods* 8 (4): 391–397. (Cited on page 49).
- McNaughton, N., and R. G M Morris. 1987b. „Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats.“ *Behavioural Brain Research* 24 (1): 39–46. (Cited on pages 25, 27).
- McNaughton, N., J. Richardson, and C. Gore. 1986. „Reticular elicitation of hippocampal slow waves: Common effects of some anxiolytic drugs.“ *Neuroscience* 19 (3): 899–903. (Cited on page 32).
- McQuiston, A R, and D V Madison. 1999. „Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons.“ *J Neurosci* 19 (14): 5693–5702. (Cited on page 109).
- Miles, Richard, and R K Wong. 1986. „Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus.“ *The Journal of physiology* 373:397–418. (Cited on pages 13, 14).
- Miles, Richard, and Robert K.S. Wong. 1987. „Latent synaptic pathways revealed after tetanic stimulation in the hippocampus.“ *Nature* 329 (6141): 724–726. (Cited on page 14).
- Miles, Richard, and Robert Wong. 1983. „Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus.“ (Cited on pages 14, 44).
- Miller, V M, and Phillip J. Best. 1980. „Spatial correlates of hippocampal unit activity are altered by lesions of the fornix and endorhinal cortex.“ *Brain research* 194 (2): 311–23. (Cited on page 22).
- Mishra, Rajiv K., Sooyun Kim, Segundo J. Guzman, and Peter Jonas. 2016. „Symmetric spike timing-dependent plasticity at CA3–CA3 synapses optimizes storage and recall in autoassociative networks.“ *Nature Communications* 7 (May): 11552. (Cited on pages 14, 15).

- Mitchell, S J, J N Rawlins, O Steward, and D S Olton. 1982. „Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2 (3): 292–302. (Cited on page 31).
- Mitchell, Susan J., and James B. Ranck. 1980. „Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats.“ *Brain Research* 189 (1): 49–66. (Cited on page 34).
- Mizumori, S J Y, B L McNaughton, C A Barnes, and K B Fox. 1989. „Preserved Spatial Coding in Hippocampal CA1 Pyramidal Cells During Reversible Suppression of CA3c Output: Evidence for Pattern Completion in Hippocampus.“ *The Journal of Neuroscience* 9 (11): 3915–3928. (Cited on page 21).
- Mizumori, S. J Y, G. M. Perez, M. C. Alvarado, C. A. Barnes, and B. L. McNaughton. 1990. „Reversible inactivation of the medial septum differentially affects two forms of learning in rats.“ *Brain Research* 528 (1): 12–20. (Cited on page 31).
- Montgomery, Johanna M., Paul Pavlidis, and Daniel V. Madison. 2001. „Pair recordings reveal all-silent synaptic connections and the postsynaptic expression of long-term potentiation.“ *Neuron* 29 (3): 691–701. (Cited on page 15).
- Montgomery, S. M., A. Sirota, and G. Buzsáki. 2008. „Theta and Gamma Coordination of Hippocampal Networks during Waking and Rapid Eye Movement Sleep.“ *Journal of Neuroscience* 28 (26): 6731–6741. (Cited on page 34).
- Nádasdy, Zoltán, Hajime Hirase, András Czurkó, Jozsef Csicsvari, and György Buzsáki. 1999. „Replay and Time Compression of Recurring Spike Sequences in the Hippocampus.“ *The Journal of Neuroscience* 19 (21): 9497–9507. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on page 39).
- Nadel, Lynn, and M Moscovitch. 1997. „Memory cosolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex.“ *Current Opinion in Neurobiology* 7 (October 2012): 217–227. (Cited on page 24).
- Nakashiba, Toshiaki, Jennie Z. Young, Thomas J. McHugh, Derek L. Buhl, and Susumu Tonegawa. 2008. „Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning.“ *Science* 319 (5867): 1260–1264. (Cited on pages 25, 26).
- Nakashiba, Toshiaki, Jesse D Cushman, Kenneth a Pelkey, et al. 2012. „Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion.“ *Cell* 149 (1): 188–201. (Cited on page 28).
- Nakazawa, Kazu, Linus D. Sun, Michael C. Quirk, et al. 2003. „Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience.“ *Neuron* 38 (2): 305–315. (Cited on page 25).
- Nakazawa, Kazu, Michael C Quirk, Raymond A Chitwood, et al. 2002. „Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall.“ *Science (New York, N.Y.)* 297 (5579): 211–8. (Cited on pages 25, 26).
- Neher, Erwin, and Bert Sakmann. 1976. „Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.“ *Nature* 260 (5554): 799–802. arXiv: 0028–0836. (Cited on page 51).
- Nicoll, Roger a, and Dietmar Schmitz. 2005. „Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses.“ *Nature reviews. Neuroscience* 6 (11): 863–76. (Cited on pages 12, 13).
- Nimchinsky, E. A. 2004. „The Number of Glutamate Receptors Opened by Synaptic Stimulation in Single Hippocampal Spines.“ *Journal of Neuroscience* 24 (8): 2054–2064. (Cited on page 14).
- Nusser, Zoltan, Rafael Lujan, Gregor Laube, et al. 1998. „Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus.“ *Neuron* 21 (3): 545–559. (Cited on page 14).

- Oddie, Scott D., Brain H. Bland, Luis V. Colom, and Robert P. Vertes. 1994. „The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway.“ *Hippocampus* 4 (4): 454–473. (Cited on page 32).
- O’Keefe, J., and J. Dostrovsky. 1971. „The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.“ *Brain Research* 34 (1): 171–175. (Cited on pages 3, 20, 39).
- O’Keefe, John. 1976. „Place units in the hippocampus of the freely moving rat.“ *Experimental Neurology* 51 (1): 78–109. (Cited on page 36).
- O’Keefe, John, and L. Nadel. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, 168:191–192. 3. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on pages 36, 37).
- O’Keefe, John, and Michael L. Recce. 1993. „Phase relationship between hippocampal place units and the hippocampal theta rhythm.“ *Hippocampus* 3 (3): 317–330. (Cited on pages 35, 39, 49).
- Olshausen, Bruno A., and David J. Field. 2004. „Sparse coding of sensory inputs.“ *Current Opinion in Neurobiology* 14 (4): 481–487. arXiv: 1409.1556. (Cited on page 39).
- Olton, David S., Michael Branch, and Phillip J. Best. 1978. „Spatial correlates of hippocampal unit activity.“ *Experimental Neurology* 58 (3): 387–409. (Cited on page 21).
- O’Neill, Joseph, Barty Pleydell-Bouverie, David Dupret, and Jozsef Csicsvari. 2010. *Play it again: reactivation of waking experience and memory*. (Cited on page 63).
- O’Reilly, Randall C., and James L McClelland. 1994. „Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off.“ *Hippocampus* 4 (6): 661–682. (Cited on page 25).
- Otto, C, Y Kovalchuk, D P Wolfer, et al. 2001. „Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (15): 5520–5527. (Cited on page 28).
- Patil, M M, and M E Hasselmo. 1999. „Modulation of inhibitory synaptic potentials in the piriform cortex.“ *Journal of neurophysiology* 81 (5): 2103–18. (Cited on page 109).
- Pavlidis, Constantine, Yoram J. Greenstein, Mark Grudman, and Jonathan Winson. 1988. „Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of θ -rhythm.“ *Brain Research* 439 (1-2): 383–387. (Cited on page 35).
- Pavlidis, P, and D V Madison. 1999. „Synaptic transmission in pair recordings from CA3 pyramidal cells in organotypic culture.“ *Journal of neurophysiology* 81 (6): 2787–2797. (Cited on page 15).
- Petersen, C. C. H., T. T. G. Hahn, M. Mehta, A. Grinvald, and B. Sakmann. 2003. „Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23): 13638–13643. (Cited on pages 40, 55).
- Petersen, Carl C.H. 2017. *Whole-Cell Recording of Neuronal Membrane Potential during Behavior*. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 53).
- Pickenhain, L., and F. Klingberg. 1967. „Hippocampal slow wave activity as a correlate of basic behavioral mechanisms in the rat.“ *Progress in brain research* 27 (C): 218–27. (Cited on page 38).
- Pinault, Didier. 1996. „A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin.“ *Journal of Neuroscience Methods* 65 (2): 113–136. (Cited on page 39).
- Pinheiro, Paulo S, David Perrais, Françoise Coussen, et al. 2007. „GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12181–12186. (Cited on pages 12, 13).

- Pinheiro, Paulo S., Frédéric Lanore, Julien Veran, et al. 2013. „Selective block of postsynaptic kainate receptors reveals their function at hippocampal mossy fiber synapses.“ *Cerebral Cortex* 23 (2): 323–331. (Cited on page 11).
- Pitler, T. A., and B. E. Alger. 1992. „Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice.“ *The Journal of Physiology* 450 (1): 127–142. (Cited on page 109).
- Polack, Pierre Olivier, Jonathan Friedman, and Peyman Golshani. 2013. „Cellular mechanisms of brain state-dependent gain modulation in visual cortex.“ *Nature neuroscience* 16 (9): 1331–9. (Cited on pages 55, 56, 63, 104, 106, 109, 110).
- Pospischil, M., Z. Piwkowska, T. Bal, and A. Destexhe. 2009. „Extracting synaptic conductances from single membrane potential traces.“ *Neuroscience* 158 (2): 545–552. arXiv: 0807.3238. (Cited on page 106).
- Poulet, James F a, and Carl C H Petersen. 2008. „Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice.“ *Nature* 454 (7206): 881–5. (Cited on pages 55, 56).
- Purves, R.D. 1981. „Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis.“ (Cited on page 51).
- Quirk, G J, R U Muller, J L Kubie, and J B Ranck. 1992. „The positional firing properties of medial entorhinal neurons: description and comparison with hippocampal place cells.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12 (5): 1945–1963. (Cited on page 22).
- Quiroga, Rodrigo Quian. 2013. „Gnostic cells in the 21st century“: 1–9. (Cited on page 63).
- Raastad, Morten. 1995. „Extracellular Activation of Unitary Excitatory Synapses Between Hippocampal CA3 and CA1 Pyramidal Cells.“ *European Journal of Neuroscience* 7 (9): 1882–1888. (Cited on page 17).
- Ramirez, Jan Marino, Andrew K. Tryba, and Fernando Peña. 2004. „Pacemaker neurons and neuronal networks: An integrative view.“ *Current Opinion in Neurobiology* 14 (6): 665–674. (Cited on page 31).
- Ranck, James B. 1973. „Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats.“ *Experimental Neurology* 41 (2): 532–555. (Cited on page 20).
- Rebola, Nelson, Rafael Lujan, Rodrigo A. Cunha, and Christophe Mulle. 2008. „Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses.“ *Neuron* 57 (1): 121–134. (Cited on pages 11, 13).
- Rebola, Nelson, Mario Carta, Frederic Lanore, Christophe Blanchet, and Christophe Mulle. 2011. „NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses.“ *Nature neuroscience* 14 (6): 691–693. (Cited on page 13).
- Rebola, Nelson, Mario Carta, and Christophe Mulle. 2017. *Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding*. (Cited on pages 21, 28).
- Reed, J M, and L R Squire. 1998. „Retrograde amnesia for facts and events: findings from four new cases.“ *J Neurosci* 18 (10): 3943–3954. (Cited on page 24).
- Reimer, Jacob, Emmanouil Froudarakis, Cathryn R. Cadwell, et al. 2014. „Pupil Fluctuations Track Fast Switching of Cortical States during Quiet Wakefulness.“ *Neuron* 84 (2): 355–362. (Cited on pages 43, 58, 68).
- Reimer, Jacob, Matthew J. McGinley, Yang Liu, et al. 2016. „Pupil fluctuations track rapid changes in adrenergic and cholinergic activity in cortex.“ *Nature Communications* 7 (May): 1–7. (Cited on page 109).

- Renshaw, B., a. Forbes, and B. R. Morison. 1940. „Activity of Isocortex and Hippocampus: Electrical Studies with Micro-Electrodes.“ *Journal of Neurophysiology* 3:74–105. (Cited on page 39).
- Rios, Gustavo, Evgueniy V. Lubenov, Derrick Chi, Michael L. Roukes, and Athanassios G. Siapas. 2016. „Nanofabricated Neural Probes for Dense 3-D Recordings of Brain Activity.“ *Nano Letters* 16 (11): 6857–6862. (Cited on page 49).
- Rolls, Edmund T. 1996. „A theory of hippocampal function in memory.“ *Hippocampus* 6 (6): 601–20. (Cited on page 25).
- Rolls, Edmund T., Simon M. Stringer, and Thomas Elliot. 2006. „Entorhinal cortex grid cells can map to hippocampal place cells by competitive learning.“ *Network: Computation in Neural Systems* 17 (4): 447–465. (Cited on pages 22, 25, 27).
- Rolls, Edmund, and Alessandro Treves. 1998. *Neural Networks and Brain Function*. 63:415–23. 4. Oxford University Press. arXiv: arXiv:1011.1669v3. (Cited on pages 25, 27).
- Rosenmund, Christian, John D Clements, Gary L Westbrook, and Gary L Westbrook. 1993. „Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse.“ *Advancement Of Science* 262 (5134): 754–757. (Cited on page 17).
- Routtenberg, Aryeh. 2010. „Adult learning and remodeling of hippocampal mossy fibers: Unheralded participant in circuitry for long-lasting spatial memory.“ *Hippocampus* 20 (1): 44–45. (Cited on page 28).
- Roux, Lisa, Bo Hu, Ronny Eichler, Eran Stark, and György Buzsáki. 2017. „Sharp wave ripples during learning stabilize the hippocampal spatial map.“ *Nature Neuroscience* 20 (6): 845–853. (Cited on page 37).
- Ruediger, Sarah, Claudia Vittori, Ewa Bednarek, et al. 2011. „Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision.“ *Nature* 473 (7348): 514–518. (Cited on page 28).
- Sachidhanandam, Shankar, Christophe Blanchet, Yannick Jeantet, Yoon H Cho, and Christophe Mulle. 2009. „Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (15): 5000–5008. (Cited on pages 11, 13).
- Salin, P A, Massimo Scanziani, R C Malenka, and Roger A Nicoll. 1996. „Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 13304–9. (Cited on page 12).
- Sander, J W, and Simon D Shorvon. 1996. „Epidemiology of the epilepsies.“ *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 61 (5): 433–43. (Cited on page 44).
- Sargolini, Francesca, Marianne Fyhn, Torkel, et al. 2006. „Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex.“ *Science* 312 (5774): 758–762. (Cited on page 22).
- Schacter, D L, and E Tulving. 1994. *What are the memory systems of 1994?* (Cited on page 23).
- Schlingloff, Dániel, Szabolcs Káli, Tamás F Freund, Norbert Hájos, and Attila I Gulyás. 2014. „Mechanisms of sharp wave initiation and ripple generation.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (34): 11385–98. (Cited on page 9).
- Schmidt-Hieber, Christoph, and Matthew F. Nolan. 2017. „Synaptic integrative mechanisms for spatial cognition.“ *Nature Neuroscience* 20 (11): 1483–1492. (Cited on pages 56, 63).

- Schmidt-Hieber, Christoph, Michael Häusser, and Michael Hausser. 2013. „Cellular mechanisms of spatial navigation in the medial entorhinal cortex.“ *Nature neuroscience* 16 (3): 325–31. (Cited on pages 55, 56).
- Schneider, David M., Anders Nelson, and Richard Mooney. 2014. „A synaptic and circuit basis for corollary discharge in the auditory cortex.“ *Nature* 513 (7517): 189–194. arXiv: NIHMS150003. (Cited on pages 55, 56, 104).
- Schwartzkroin, Philip A., and Knut Wester. 1975. „Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice.“ *Brain Research* 89 (1): 107–119. (Cited on page 17).
- Scoville, W B, and B Milner. 1957. „Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.“ *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 20 (11): 11 –21. (Cited on pages 3, 20, 24).
- Selkoe, Dennis J. 2002. „Alzheimer’s disease is a synaptic failure.“ *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594): 789–91. (Cited on page 45).
- Senzai, Yuta, and György Buzsáki. 2017. „Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells.“ *Neuron* 93 (3): 691–704.e5. (Cited on page 23).
- Sheng, Morgan, Bernardo L Sabatini, and Thomas C Südhof. 2012. „Synapses and Alzheimer’s disease.“ *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (5). (Cited on page 45).
- Siapas, Athanassios G., and Matthew A. Wilson. 1998. „Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep.“ *Neuron* 21 (5): 1123–1128. (Cited on page 38).
- Sigworth, F.J. 1983. „Electronic design of the patch clamp.“ *Single channel recording*, no. 1981: 95–127. (Cited on page 53).
- Sigworth, Frederick J., and Erwin Neher. 1980. „Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells.“ *Nature* 287 (5781): 447–449. (Cited on page 51).
- Sik, A., N. Tamamaki, and T. F. Freund. 1993. „Complete Axon Arborization of a Single CA3 Pyramidal Cell in the Rat Hippocampus, and its Relationship With Postsynaptic Parvalbumin-containing Interneurons.“ *European Journal of Neuroscience* 5 (12): 1719–1728. (Cited on page 14).
- Silver, R. Angus, Akiko Momiyama, and Stuart G. Cull-Candy. 1998. „Locus of frequency-dependent depression identified with multiple-probability fluctuation analysis at rat climbing fibre - Purkinje cell synapses.“ *Journal of Physiology* 510 (3): 881–902. (Cited on page 11).
- Simić, G, I Kostović, Bengt Winblad, and N Bogdanović. 1997. „Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer’s disease.“ *The Journal of comparative neurology* 379 (4): 482–94. (Cited on page 9).
- Skaggs, William E., and Bruce L. McNaughton. 1996a. „Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience.“ *Science* 271 (5257): 1870–1873. (Cited on page 37).
- Skaggs, William E, and Bruce L McNaughton. 1996b. „Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences.“ *Hippocampus* 6:149–172. (Cited on pages 35, 39).
- Song, Sen, Kenneth D. Miller, and L. F. Abbott. 2000. „Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity.“ *Nature Neuroscience* 3 (9): 919–926. (Cited on page 15).
- Sorra, KE, and Kristen M Harris. 1993. „Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13 (9): 3736–3748. (Cited on page 17).

- Spiers, Hugo J., Neil Burgess, Tom Hartley, Faraneh Vargha-Khadem, and John O'Keefe. 2001. „Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching.“ *Hippocampus* 11 (6): 715–725. (Cited on page 19).
- Spruston, N, D B Jaffe, S H Williams, and D Johnston. 1993. „Voltage- and space-clamp errors associated with the measurement of electrotonically remote synaptic events.“ *Journal of neurophysiology* 70 (2): 781–802. (Cited on page 54).
- Squire., R. Larry & Alvarez., Pablo. 1995. „Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective.“ *Current opinion in Neurobiology*, no. 5: 169–177. (Cited on page 38).
- Squire, L R, and S ~Zola Morgan. 1991. „The medial temporal lobe memory system.“ *Science* %L Squire1991 253:1380–1386. (Cited on page 19).
- Squire, L R, B Knowlton, and G Musen. 1993. „The structure and organization of memory.“ *Annual review of psychology* 44:453–95. (Cited on page 24).
- Squire, Larry R, Stephen Kosslyn, Stuart Zola-Morgan, Frank Haist, and Gail Musen. 1992. „Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans.“ *Psychological Review* 99 (2): 195–231. (Cited on page 23).
- Staley, K J, T S Otis, and I Mody. 1992. „Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings.“ *Journal of neurophysiology* 67 (5): 1346–1358. (Cited on page 51).
- Stone, J. 1973. „Sampling properties of microelectrodes assessed in the cat's retina.“ *Journal of Neurophysiology* 36 (6): 1071–1079. (Cited on page 39).
- Strange, Bryan a, Menno P Witter, Ed S Lein, and Edvard I Moser. 2014. „Functional organization of the hippocampal longitudinal axis.“ *Nature Publishing Group* 15 (10): 655–669. (Cited on page 19).
- Stuart, G, N Spruston, B Sakmann, and M Hausser. 1997. „Action potential initiation and back propagation in neurons of the mammalian central nervous system.“ *Trends in Neurosciences* 20 (3): 125–131. (Cited on page 11).
- Stumpf, Ch. 1965. „The fast component in the electrical activity of rabbit's hippocampus.“ *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 18 (5): 477–486. (Cited on pages 30, 35).
- Sun, Qian, Alaba Sotayo, Alejandro S Cazzulino, et al. 2017. „Proximodistal Heterogeneity of Hippocampal CA3 Pyramidal Neuron Intrinsic Properties, Connectivity, and Reactivation during Memory Recall.“ *Neuron* 95 (3): 656–672.e3. (Cited on pages 105, 113).
- Szabadics, János, and Ivan Soltesz. 2009. „Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (13): 4239–4251. (Cited on page 7).
- Szirmai, Imre, György Buzsáki, and Anita Kamondi. 2012. „120 years of hippocampal Schaffer collaterals.“ *Hippocampus* 22 (7): 1508–1516. (Cited on pages 15, 16).
- Takumi, Y, V Ramirez-Leon, P Laake, E Rinvik, and O P Ottersen. 1999. „Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses.“ *Nat Neurosci* 2 (7): 618–24. (Cited on page 14).
- Tamamaki, Nobuaki, and Yoshiaki Nojyo. 1993. „Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin.“ *Hippocampus* 3 (4): 471–480. (Cited on page 18).

- Tang, Qiusong, Michael Brecht, and Andrea Burgalossi. 2014. „Juxtacellular recording and morphological identification of single neurons in freely moving rats.“ *Nature protocols* 9 (10): 2369–81. (Cited on page 39).
- Teng, Edmond, and Larry R Squire. 1999. „Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage.“ 23 (1998): 1998–2000. (Cited on page 24).
- Terrazas, A. 2005. „Self-Motion and the Hippocampal Spatial Metric.“ *Journal of Neuroscience* 25 (35): 8085–8096. (Cited on page 34).
- Thinschmidt, J. S., G. G. Kinney, and B. Kocsis. 1995. „The supramammillary nucleus: Is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm?“ *Neuroscience* 67 (2): 301–312. (Cited on page 32).
- Thompson, Carol L., Sayan D. Pathak, Andreas Jeromin, et al. 2008. „Genomic Anatomy of the Hippocampus.“ *Neuron* 60 (6): 1010–1021. (Cited on page 113).
- Tóth, K, T F Freund, and R Miles. 1997. „Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum.“ *The Journal of physiology* 500 (Pt 2 (2): 463–74. (Cited on pages 31, 34).
- Tóth, K, Z Borhegyi, and T F Freund. 1993. „Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of broca complex.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13 (9): 3712–3724. (Cited on page 31).
- Toth, Katalin, Gregory Soares, J Josh Lawrence, Emily Philips-tansey, and Chris J Mcbain. 2000. „Differential Mechanisms of Transmission at Three Types of Mossy Fiber Synapse.“ 20 (22): 8279–8289. (Cited on pages 7, 13).
- Towe, A. L., and G. W. Harding. 1970. „Extracellular microelectrode sampling bias.“ *Experimental Neurology* 29 (2): 366–381. (Cited on page 39).
- Traub, Roger D., and A. Bibbig. 2000. „A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons.“ *The Journal of neuroscience* 20 (6): 2086–2093. (Cited on page 37).
- Traub, Roger D, and Robert K.S. Wong. 1982. „Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy.“ *Science* 216 (4547): 745–747. (Cited on page 37).
- Troncoso, X., J. Otero-Millan, S. Macknik, I. Serrano-Pedraza, and S. Martinez-Conde. 2010. „Saccades and microsaccades during visual fixation, exploration, and search: Foundations for a common saccadic generator.“ *Journal of Vision* 9 (8): 447–447. (Cited on page 34).
- Trygve Solstad, Edvard I. Moser, and Gaute T. Einevoll. 2007. „From Grid Cells to Place Cells: A Mathematical Model.“ *Hippocampus* 17 (9): 801–812. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 22).
- Tulving, E. 1972. *Episodic and semantic memory*. (Cited on page 23).
- Tulving, Endel. 2002. „EPISODIC MEMORY : From Mind to Brain.“ *Annual Review of Psychology* 53:1–25. (Cited on page 23).
- Turner, D. A., X. -G Li, G. K. Pyapali, A. Ylinen, and G. Buzsaki. 1995. „Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo.“ *Journal of Comparative Neurology* 356 (4): 580–594. (Cited on page 113).
- Tzounopoulos, Thanos, Roger Janz, Thomas C. Südhof, Roger A. Nicoll, and Robert C. Malenka. 1998. „A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses.“ *Neuron* 21 (4): 837–845. (Cited on page 13).
- Ulrich, Daniel, and Bernhard Bettler. 2007. „GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity.“ *Current Opinion in Neurobiology* 17 (3): 298–303. (Cited on page 43).

- Valero, Manuel, Elena Cid, Robert G Averkin, et al. 2015. „Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples.“ *Nature neuroscience* 18 (9): 1281–90. (Cited on page 42).
- Vanderwolf, C H. 1969. „Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat.“ *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 26 (4): 407–18. (Cited on pages 31, 34, 36, 67).
- Vanderwolf, C. H. 1971. „Limbic-diencephalic mechanisms of voluntary movement.“ *Psychological Review* 78 (2): 83–113. (Cited on page 30).
- Varga, Viktor, Balázs Hangya, Kinga Kránitz, et al. 2008. „The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum.“ *Journal of Physiology* 586 (16): 3893–3915. (Cited on page 31).
- Vargha-Khadem, Faraneh, D G Gadian, K E Watkins, et al. 1997. „Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory.“ *Science (New York, N.Y.)* 277 (5324): 376–380. (Cited on page 19).
- Vazdarjanova, A. 2004. „Differences in Hippocampal Neuronal Population Responses to Modifications of an Environmental Context: Evidence for Distinct, Yet Complementary, Functions of CA3 and CA1 Ensembles.“ *Journal of Neuroscience* 24 (29): 6489–6496. (Cited on page 27).
- Vergnano, Angela Maria, Nelson Rebola, Leonid P. Savtchenko, et al. 2014. „Zinc dynamics and action at excitatory synapses.“ *Neuron* 82 (5): 1101–1114. (Cited on page 11).
- Vertes, R P. 1981. „An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization.“ *Journal of neurophysiology* 46 (5): 1140–1159. (Cited on page 32).
- Vertes, R. P., and B. Kocsis. 1997. „Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus.“ *Neuroscience* 81 (4): 893–926. (Cited on page 31).
- Vertes, Robert P. 1980. „Brain stem activation of the hippocampus: A role for the magnocellular reticular formation and the MLF.“ *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 50 (1-2): 48–58. (Cited on page 32).
- Vertes, Robert P., Walter B. Hoover, and Gonzalo Viana Di Prisco. 2004. „Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance.“ *Behavioral and cognitive neuroscience reviews* 3 (3): 173–200. (Cited on page 33).
- Viana Da Silva, Silvia Viana, Matthias Georg Haberl, Pei Zhang, et al. 2016. „Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer’s disease involve neuronal adenosine A2A receptors.“ *Nature Communications* 7. (Cited on pages 15, 28, 45).
- Vignes, M, and G L Collingridge. 1997. „The synaptic activation of kainate receptors.“ *Nature* 388 (6638): 179–182. (Cited on page 11).
- Villarréal, Desiree M, Amanda L Gross, and Brian E Derrick. 2007. „Modulation of CA3 Afferent Inputs by Novelty and Theta Rhythm.“ *The Journal of Neuroscience* 27 (49): 13457–13467. (Cited on page 28).
- Viney, Tim J, Balint Lasztozsi, Linda Katona, et al. 2013. „Network state-dependent inhibition of identified hippocampal CA3 axo-axonic cells in vivo.“ *Nature neuroscience* 16 (12): 1802–11. (Cited on page 9).
- Vinogradova, O. S., E. S. Brazhnik, V. S. Stafekhina, and V. F. Kichigina. 1995. „Modulation of septal influences on hippocampal neurons by cholinergic substances.“ *Neuroscience and Behavioral Physiology* 25 (6): 453–461. (Cited on page 31).
- Vogt, K E, and W G Regehr. 2001. „Cholinergic modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 area of the hippocampus.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (1): 75–83. (Cited on page 110).

- Voigt, B. C., M. Brecht, and A. R. Houweling. 2008. „Behavioral Detectability of Single-Cell Stimulation in the Ventral Posterior Medial Nucleus of the Thalamus.“ *Journal of Neuroscience* 28 (47): 12362–12367. (Cited on page 39).
- Vyleta, Nicholas P., and Peter Jonas. 2014. „Loose coupling between Ca²⁺ channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse.“ *Science (New York, N.Y.)* 343 (6171): 665–70. (Cited on page 14).
- Warrington, E. K. 1996. „Studies of retrograde memory: A long-term view.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (24): 13523–13526. (Cited on page 24).
- West, M J, L Slomianka, and H J Gundersen. 1991. „Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.“ *The Anatomical record* 231 (4): 482–97. (Cited on page 4).
- Whishaw, I. Q., and C. H. Vanderwolf. 1973. „Hippocampal EEG and behavior: Change in amplitude and frequency of RSA (Theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats.“ *Behavioral Biology* 8 (4): 461–484. (Cited on page 30).
- Whishaw, I. Q., and C. H. Vanderwolf. 1971. „Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering.“ *Physiology & behavior* 6 (4): 391–7. (Cited on pages 38, 105).
- Williams, Stephen R, and Simon J Mitchell. 2008. „Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons.“ *Nature neuroscience* 11 (7): 790–798. (Cited on page 54).
- Wilson, Matthew A, and Bruce L McNaughton. 1993. „Dynamics of the Hippocampal Ensemble Code for Space.“ *Science* 261 (5124): 1055–1058. (Cited on page 49).
- Winson, Jonathan, and Charles Abzug. 1977. „Gating of neuronal transmission in the hippocampus: Efficacy of transmission varies with behavioral state.“ *Science* 196 (4295): 1223–1225. (Cited on page 40).
- Witter, M. P., H. J. Groenewegen, F. H. Lopes da Silva, and A. H.M. Lohman. 1989. „Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region.“ *Progress in Neurobiology* 33 (3): 161–253. (Cited on page 17).
- Witter, Menno P. 2007. „Intrinsic and extrinsic wiring of CA3 : Indications for connectional heterogeneity.“ 3:705–713. (Cited on page 18).
- Wittner, Lucia, and Richard Miles. 2007. „Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus.“ *Journal of Physiology* 584 (3): 867–883. (Cited on pages 37, 44).
- Wolf, H K, and O D Wiestler. 1993. „Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders.“ *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 3 (4): 371–80. (Cited on page 44).
- Wong, R. K S, and D. A. Prince. 1978. „Participation of calcium spikes during intrinsic burst firing in hippocampal neurons.“ *Brain Research* 159 (2): 385–390. (Cited on page 6).
- Wong, R. K., D. A. Prince, and A. I. Basbaum. 1979. „Intradendritic recordings from hippocampal neurons.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (2): 986–990. (Cited on page 6).
- Yamamoto, Tsuneyuki, Shigenori Watanabe, Ryozi Oishi, and Showa Ueki. 1979. „Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats.“ *Brain Research Bulletin* 4 (4): 491–495. (Cited on page 32).
- Yassa, Michael A., Joyce W. Lacy, Shauna M. Stark, et al. 2011. „Pattern separation deficits associated with increased hippocampal CA3 and dentate gyrus activity in nondemented older adults.“ *Hippocampus* 21 (9): 968–979. (Cited on page 27).

- Ylinen, Aarne. 1995. „Sharp Wave-Associated High-Frequency Oscillation (200 Hz) in the Intact Hippocampus : Network and Intracellular Mechanisms.“ 15 (January). (Cited on pages 37, 42, 49).
- Ylinen, Aarne, A Bragin, Z Nádasdy, et al. 1995. „Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms.“ *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (1 Pt 1): 30–46. (Cited on page 42).
- Yoder, Ryan M., and Kevin C H Pang. 2005. „Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm.“ *Hippocampus* 15 (3): 381–392. (Cited on page 109).
- Yokoi, Mineto, Katsunori Kobayashi, Toshiya Manabe, et al. 1996. „Impairment of Hippocampal Mossy Fiber LTD in Mice Lacking mGluR2.“ *Science* 273 (5275): 645–647. (Cited on page 13).
- Yu, Yong Chun, Ronald S. Bultje, Xiaoqun Wang, and Song Hai Shi. 2009. „Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex.“ *Nature* 458 (7237): 501–504. arXiv: NIHMS150003. (Cited on page 14).
- Zucca, Stefano, Marilena Griguoli, Meryl Malézieux, et al. 2017. „Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABAA and GABAB Receptor-Mediated Inhibition.“ *The Journal of Neuroscience* 37 (3): 587–598. (Cited on pages 7, 10, 12, 40, 49, 55, 66).

heading=bibintoc

Liste des figures

1.1	La formation hippocampique	4
1.2	Organisation laminaire de la région CA3	5
1.3	Anatomie des fm.	10
1.4	Plasticités à court-terme à la synapse fibre-moussue-CP de CA3.	12
1.5	Les collatérales de Schaffer.	16
1.6	Formation hippocampique chez différentes espèces.	18
1.7	Comparaison de la formation hippocampique chez différentes espèces.	19
1.8	Les circuits de CA3 et leurs rôles dans les processus mnésiques.	21
1.9	Sites d'enregistrements et pattern de décharge des cellules de lieux dans CA3.	22
1.10	Transmission sociale de la préférence pour la nourriture.	24
1.11	Rôle de CA3 dans la mémoire épisodique	26
1.12	Représentation schématique du transfert entrée/sortie de données dans les sous-régions de l'hippocampe.	27
1.13	Exemple d'oscillations theta et LIA dans le LFP de CA3	30
1.14	Diagramme des interconnexions majeures des systèmes ascendants contrôlant le rythme theta et sa désynchronisation dans l'EEG hippocampique.	33
1.15	Oscillations theta intracellulaires et précession de phase	42
1.16	La LIA est associée avec une dépolarisation et une augmentation de la variance du potentiel de membrane des CG et des CP de CA1	43
2.1	Les différents enregistrements électrophysiologiques in vivo	50
2.2	Configuration des enregistrements intracellulaires et cellule-entière	52
2.3	Différentes configurations de la technique de patch-clamp.	53
2.4	Etapas des enregistrements en configuration cellule-entière	54
2.5	Enregistrements en cellule-entière in vivo	57
5.1	Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur le potentiel de membrane de CP de CA3 lors d'oscillations theta.	111
5.2	Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur le potentiel de membrane de CP de CA3 lors de périodes de LIA.	112
5.3	Effets de l'application d'antagonistes cholinergiques sur la modulation du potentiel de membrane des CP de CA3 lors de périodes de theta et de LIA.	113
5.4	Expression du virus AAV-CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry dans le gyrus denté	115

ANNEXES

Annexes

A. Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABA A and GABA B Receptor-Mediated Inhibition.

Zucca, Stefano; Griguoli, Marilena; **Malézieux, Meryl**; Grosjean, Noëlle; Carta, Mario; Mulle, Christophe

The Journal of Neuroscience, 2017, DOI : 10.1523/JNEUROSCI.2057-16.2017

B. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors.

Da Silva, Silvia Viana; Haberl, Matthias Georg; Zhang, Pei; Bethge, Philipp; Lemos, Cristina; Gonçalves, Nélío; Gorlewicz, Adam; **Malezieux, Meryl**; Gonçalves, Francisco Q.; Grosjean, Noëlle; Blanchet, Christophe; Frick, Andreas; Nägerl, U. Valentin; Cunha, Rodrigo A.; Mulle, Christophe

Nature Communications, 2016, DOI: 10.1038/ncomms11915

C. Supplementary information. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptor

Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses *In Vivo* by GABA_A and GABA_B Receptor-Mediated Inhibition

 Stefano Zucca,*  Marilena Griguoli,*  Meryl Malézieux, Noëlle Grosjean,  Mario Carta, and  Christophe Mulle

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS, Unité Mixte de Recherche 5297, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Despite extensive studies in hippocampal slices and incentive from computational theories, the synaptic mechanisms underlying information transfer at mossy fiber (mf) connections between the dentate gyrus (DG) and CA3 neurons *in vivo* are still elusive. Here we used an optogenetic approach in mice to selectively target and control the activity of DG granule cells (GCs) while performing whole-cell and juxtacellular recordings of CA3 neurons *in vivo*. In CA3 pyramidal cells (PCs), mf–CA3 synaptic responses consisted predominantly of an IPSP at low stimulation frequency (0.05 Hz). Upon increasing the frequency of stimulation, a biphasic response was observed consisting of a brief mf EPSP followed by an inhibitory response lasting on the order of 100 ms. Spike transfer at DG–CA3 interneurons recorded in the juxtacellular mode was efficient at low presynaptic stimulation frequency and appeared insensitive to an increased frequency of GC activity. Overall, this resulted in a robust and slow feedforward inhibition of spike transfer at mf–CA3 pyramidal cell synapses. Short-term plasticity of EPSPs with increasing frequency of presynaptic activity allowed inhibition to be overcome to reach spike discharge in CA3 PCs. Whereas the activation of GABA_A receptors was responsible for the direct inhibition of light-evoked spike responses, the slow inhibition of spiking activity required the activation of GABA_B receptors in CA3 PCs. The slow inhibitory response defined an optimum frequency of presynaptic activity for spike transfer at ~10 Hz. Altogether these properties define the temporal rules for efficient information transfer at DG–CA3 synaptic connections in the intact circuit.

Key words: CA3; dentate gyrus; feedforward inhibition; hippocampus; *in vivo*; synapse

Significance Statement

Activity-dependent changes in synaptic strength constitute a basic mechanism for memory. Synapses from the dentate gyrus (DG) to the CA3 area of the hippocampus are distinctive for their prominent short-term plasticity, as studied in slices. Plasticity of DG–CA3 connections may assist in the encoding of precise memory in the CA3 network. Here we characterize DG–CA3 synaptic transmission *in vivo* using targeted optogenetic activation of DG granule cells while recording in whole-cell patch-clamp and juxtacellular configuration from CA3 pyramidal cells and interneurons. We show that, *in vivo*, short-term plasticity of excitatory inputs to CA3 pyramidal cells combines with robust feedforward inhibition mediated by both GABA_A and GABA_B receptors to control the efficacy and temporal rules for information transfer at DG–CA3 connections.

Introduction

On theoretical grounds, the architecture of hippocampal CA3 circuits appears well adapted for the rapid storage and retrieval of

associative memories (for review, see Kesner and Rolls, 2015). The two major features of CA3 circuits consist of the extensive excitatory interconnections between CA3 pyramidal cells (PCs) through associational/commissural fibers, which create the anatomical basis for the autoassociative network, and the sparse but

Received June 28, 2016; revised Nov. 2, 2016; accepted Nov. 20, 2016.

Author contributions: S.Z., M.G., and C.M. designed research; S.Z., M.G., M.M., and M.C. performed research; S.Z., M.G., M.M., N.G., M.C., and C.M. analyzed data; S.Z., M.G., and C.M. wrote the paper.

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the European Commission (SyMBaD Marie Curie ITN FP7/2007–2013 Grant agreement no. 238608, fellowship to S.Z.), the Agence Nationale de la Recherche (contract HIPPECODE), and the LabEx BRAIN. We thank Jérôme Epsztein for fruitful initial discussions and help with *in vivo* patch-clamp recordings; François Georges and Delphine Girard for their help with *in vivo* pharmacological experiments; and Adam Gorlewicz for image acquisition of reconstructed neurons. We also thank Virginie Labrousse for help with confocal microscopy, which was performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, and member of the national infrastructure France Biolm-

aging. In addition, we thank Elisabeth Normand, Audrey Lacquemant, and Amandine Gautier for taking care of the mice.

*S.Z. and M.G. are equal first authors.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Christophe Mulle, University of Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France. E-mail: christophe.mulle@u-bordeaux.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2057-16.2017

Copyright © 2017 the authors 0270-6474/17/370587-12\$15.00/0

powerful connections from the dentate gyrus (DG) through mossy fiber (mf) synapses, which are proposed to assist in pattern completion and pattern separation (Guzowski et al., 2004; Rolls and Treves, 2011). DG granule cells (GCs) send unmyelinated mf axons to the stratum lucidum, where giant mossy fiber boutons make synaptic contacts with thorny excrescences on basal dendrites of CA3 PCs (Chicurel and Harris, 1992; Rollenhagen et al., 2007; Wilke et al., 2013). Filopodial extensions of mf terminals and en passant synapses provide monosynaptic innervation to local interneurons (INs; Szabadics and Soltesz, 2009), creating a robust feedforward inhibitory circuit (Mori et al., 2004; Torborg et al., 2010). Spike transfer at DG–CA3 connections depends on a balance between direct excitation and feedforward inhibition, both of which are under the control of different short-term plasticity mechanisms (Nicoll and Schmitz, 2005; Evstratova and Tóth, 2014). In slice recordings, with a low frequency of presynaptic GC activity (<0.1 Hz), excitatory synaptic potentials (mf–CA3 EPSPs) have small amplitudes, because of a very low release probability at individual release sites ($p < 0.01$; Lanore et al., 2012), and are insufficient to discharge CA3 PCs. When GCs increase tonic low-frequency firing rate from 0.05 Hz up to theta range frequency or during trains of spikes (with frequencies from 10 to 100 Hz; Nicoll and Schmitz, 2005), synaptic responses in single mf–CA3 PC synapses are capable of triggering postsynaptic action potentials (Sachidhanandam et al., 2009). Hence, the pattern of presynaptic activity can induce prominent short-term plasticity making mf–CA3 synapses work as a “conditional detonator” synapse (Henze et al., 2002). Although synaptic transmission and plasticity at DG–CA3 synapses have been widely studied *in vitro* (Nicoll and Schmitz, 2005; Evstratova and Tóth, 2014; Cherubini and Miles, 2015), how these events operate *in vivo* are less clear (Henze et al., 2002; Klausnitzer and Manahan-Vaughan, 2008), thus limiting our understanding of the mf synaptic contribution to CA3 network function. It is therefore important to study the functional properties of mf–CA3 synapses *in vivo*. In the present article, we aimed at directly characterizing synaptic transmission rules at mf–CA3 neurons *in vivo* and at understanding how different presynaptic firing modalities (tonic low frequency vs trains of action potentials) control information transfer in the CA3 circuit. To this end, we used an optogenetic approach to selectively target and control the activity of a few GCs while performing single-cell recordings from CA3 neurons in anesthetized mice. We found that mf–CA3 PC synapses exhibited prominent short-term plasticity, as was the case *in vitro*. We show that the local feedforward inhibitory circuits tightly control information transfer at mf–CA3 synapses and that this requires the activation of both GABA_A and GABA_B receptors in CA3 PCs. The 100-ms-long inhibition mediated by GABA_B receptors appears to play an important part in defining the temporal rules for efficient spike transfer at DG–CA3 connections in the intact brain.

Materials and Methods

Mice and *in vivo* viral infection. Male POMC-Cre mice (<https://www.jax.org/strain/005965>) were used in the present study. All experimental procedures related to the use of mice were conducted according to the guidelines of the University of Bordeaux/CNRS Animal Care and Use Committee. Adeno-associated virus (AAV) serotype 2/9 containing channelrhodopsin-2 [ChR2; AAV-DIO-ChR2(H134R)-enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)] was obtained from the University of Pennsylvania Gene Therapy Program (Philadelphia, PA), with genomic titers of 2.6×10^{13} particles/ml. Viral vectors were bilaterally injected in the dorsal DG (−1.8 mm posterior to bregma; ± 1.2 mm lateral of bregma; and −1.9 mm ventral from brain surface) of POMC-Cre mice, expressing Cre-recombinase in a subpopulation of DG cells (Gao et al.,

2007) between postnatal days 14 and 16. The injection volume and flow rate (~250 nl at 50 nl/min) were controlled with an injection pump (World Precision Instruments). After a minimum of 21 d for protein expression, mice were used for experiments.

Slice electrophysiology. Slice electrophysiology was performed from parasagittal hippocampal slices as described previously (Sachidhanandam et al., 2009). Microelectrodes (3–5 M Ω) were prepared from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus) using a P-97 puller (Sutter Instrument). For voltage-clamp experiments, pipettes were filled with an intracellular solution containing the following (in mM): 140 Cs methanesulfonate, 4 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 MgCl₂, 3 ATP-Na, 5 phosphocreatine, at 0.33 GTP, at 280–300 mOsm, pH 7.2–7.3, adjusted with KOH. For current-clamp experiments, the following internal solution was used (in mM): 120 K-methanesulfonate, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, and 2 Na-ATP, at 290–300 mOsm, pH 7.2–7.3, adjusted with KOH. To monitor the series resistance, a hyperpolarizing voltage step (−10 mV, 50 ms) was applied at the beginning of each recording. Series resistances varied between 10 and 20 M Ω , and when these changed by >20%, recordings were discarded. Measurements of membrane potentials were not corrected for the liquid junction potential error. Data were acquired with an EPC 10 amplifier (HEKA Elektronik), filtered at 2.9 kHz with a Bessel filter, digitized at 10 kHz, and stored on a personal computer for off-line analysis using custom-made macros (IGOR PRO 5.0, WaveMetrics). For optogenetic experiments, ChR2⁺ DG GCs were activated with 5 ms pulses of blue light generated by a 473 nm LED (pE1, CoolLED) under the control of the digital output of the amplifier. Light-evoked mf–CA3 EPSCs were recorded in voltage-clamp conditions at −70 mV at 34°C. Changes in mf–CA3 synaptic responses were assessed by increasing the stimulation frequency from a basal rate of 0.1 Hz (30 stimuli) to 1 Hz (30 stimuli) and 3 Hz (30 stimuli), and referred as tonic low-frequency facilitation, or during bursts of presynaptic stimulation consisting of four to five trains of 10 light stimulations delivered at 25 and 40 Hz.

***In vivo* electrophysiology.** For *in vivo* electrophysiology, surgeries and electrophysiological recordings were performed under isoflurane anesthesia. In a subset of experiments ($n = 3$ mice), a mix of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) was injected intraperitoneally to induce anesthesia before surgery and during juxtacellular recordings and were compared with those obtained in the presence of isoflurane anesthesia. Two craniotomies for the stimulating and recording sites were drilled between −1.8 and −2.3 mm posterior from bregma, and lateral coordinates were adjusted after extracellular mapping to locate the GC layer or CA3 pyramidal cell layer. Temperature was maintained between 36–37°C using a feedback-controlled heating pad (FHC). Recordings were obtained with a Multiclamp 700B amplifier connected to the Digidata 1440A system. Data were acquired with pClamp 10 (Molecular Devices), digitized at 10 kHz, filtered at 3 kHz, and analyzed off-line with Clampfit 10.4 (Molecular Devices). Activation of ChR2⁺ GCs was achieved with a 50 mW, 473 nm laser (Shanghai Dream Lasers Technology) delivered through an optic fiber [200 μ m, 0.22 numerical aperture (NA)] inserted into the dorsal DG, and positioned with a 20° angle above the dendrites of GCs in the molecular layer. Pulses of blue light (5 ms) were externally triggered using pClamp (Molecular Devices). The following light stimulation protocols were used: 0.05 Hz (baseline, 10 stimuli); 1, 3, and 10 Hz (60 stimuli); and five trains (repeated every 30 s) consisting of 10 light pulses delivered at 20 and 40 Hz.

Extracellular recordings of field potentials were obtained with glass electrodes prepared with a vertical puller PC-10 (Narishige), and the tip was broken to obtain a resistance between 1 and 3 M Ω . Electrodes were filled with a standard Ringer's solution containing the following (in mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 5 HEPES, 1.8 CaCl₂, and 1 MgCl₂. Changes in field EPSPs (fEPSPs) were measured in terms of slope change and were normalized for the slope values obtained at 0.05 Hz.

Whole-cell patch-clamp recordings were achieved using a standard blind-patch approach as previously described (Margrie et al., 2002; Lee et al., 2009). Electrodes used for whole-cell recordings were prepared before the beginning of electrophysiology experiments, had a resistance between 4 and 7 M Ω , and were filled with a solution containing 120 mM K-methanesulfonate, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, and 2 Na-

ATP, at 290–300 mOsm and pH 7.2–7.3 adjusted with KOH. The intracellular solution was supplemented with 0.2% (w/v) biocytin for *post hoc* cellular identification and morphological reconstruction. Resting membrane potential (RMP) was noted immediately upon achieving whole-cell configuration. Only GCs that showed initial RMP values less than or equal to -60 mV *in vivo* were included in the study. At the end of each recording, the injection of biocytin was achieved by applying positive current pulses (0.5–1 nA, 500 ms, for 5–10 min) through the bridge circuitry of the amplifier. Access resistance and membrane capacitance of the cells were monitored on-line with the membrane test feature of the acquisition software and analyzed off-line. The mean access resistance was 48.8 ± 3.2 M Ω (range, 10.0–89 M Ω ; 26 cells). The spontaneous firing frequency of CA3 neurons was estimated during a 1–2 min interval before any stimulation, and spikes during bursts of action potentials were counted as single events (Pernia-Andrade and Jonas, 2014). Bursting behavior of CA3 PCs was assessed using a detection threshold function with Clampfit; a burst was defined as a series of two or more spikes delimited within an interval of 50 ms, both in juxtacellular and whole-cell patch-clamp recordings. The EPSP and IPSP amplitudes were quantified by measuring the peak of the synaptic response obtained from the average trace of all the sweeps recorded at different frequencies. The duration of IPSP for patch-clamp recordings was measured from the onset of the biphasic synaptic response to baseline return values of pure inhibitory response obtained in response to 0.05–10 Hz stimulation. The duration of the EPSP was measured from the onset of the biphasic synaptic response to the theoretical return values of the excitatory component of the biphasic response obtained after 10 Hz stimulation.

Juxtacellular recordings of neuronal firing were obtained using glass electrodes (4–7 M Ω) filled with either Ringer's solution or intracellular solution (attempts at obtaining successful whole-cell patch-clamp recordings). Spike discharge probability was measured within a 30 ms interval from the beginning of the light pulse during tonic low frequencies of stimulation (0.05–10 Hz) and between light pulses during trains at 20 and 40 Hz. This interval has been chosen by considering the latency (5.1 ± 0.7 ms) plus the duration of the EPSP (19.2 ± 5.7 ms; $n = 8$) measured during patch-clamp recordings. Inhibition in juxtacellular recordings was defined as an epoch of at least 10 bins (5 ms per bin) in which the mean count per bin was at least 35% less than baseline (mean of 100 ms before light pulse). In recordings combined with the local application of drugs, the distance between recording and ejection pipettes ranged between 90 and 190 μ m. Local application of drugs *in vivo* was performed by pressure application (10 ms, 20 psi, repeated 8–10 times) through a glass ejection pipette (tip diameter, between 30 and 40 μ m) connected to a picospritzer (Parker) and glued to a sharp recording electrode (30–40 M Ω ; Georges and Aston-Jones, 2002). Drug concentrations were chosen based on previous studies showing efficient modulation of neuronal firing following local application of GABAergic antagonists *in vivo* (Paladini and Tepper, 1999; Chadderton et al., 2004). Changes in firing rate following optical stimulation of GCs (1 Hz) were recorded before and after drug application (onset of the effect for: CGP-55845, 1077 ± 237 s, $n = 7$; gabazine, 206 ± 36 s, $n = 8$).

Immunohistochemistry and image analysis. Brains were processed for *post hoc* identification of ChR2⁺ GCs and to recover the fluorescence of neurons filled with biocytin during *in vivo* whole-cell patch-clamp recordings. To estimate the number of ChR2⁺ GCs, brains were removed from the skull, postfixed for 48 h in 4% paraformaldehyde (PFA), washed in PBS, and sectioned at 40 μ m with a vibratome. Slices were treated in a blocking buffer [5% normal goat serum in 0.3% PBS–Tween 20 (PBS–T)] for 45 min and incubated with primary antibody solution for 48 h. Slices were then washed and incubated for 2–3 h with a secondary antibody. EYFP fluorescence from ChR2⁺ GCs was enhanced using a mouse anti-GFP (1:500; catalog #11814460, Sigma-Aldrich) and goat anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 488 (1:500; catalog #A21121, Thermo Fisher Scientific) diluted in PBS–T. A mounting medium containing DAPI was used (VECTASHIELD, Vector Laboratories). The slide scanner was a Nanozoomer 2.0HT with a fluorescence imaging module (Hamamatsu Photonics) using a planar apochromatic 20 $\times$ objective with NA of 0.75 combined with an additional lens 1.75 $\times$, with a 2 $\times$ 2 binning leading to a final magnification of 20 $\times$. Virtual slides were acquired with a 3CCD

camera with a time-delay and integration sensor. Fluorescent acquisitions were performed with a mercury lamp (LX2000 200W, Hamamatsu Photonics) and the set of filters adapted for GFP and DAPI fluorescence. An average of 10.1 ± 0.9 slices/mouse were analyzed in 10 mice. The analysis, area measurement, and counting of GFP⁺ cells were performed manually with the software NDP View 2 (Hamamatsu Photonics). The percentage of ChR2⁺ GCs was estimated by dividing the number of GFP⁺ cells/mouse by the total number of GCs in the hippocampi of age-matched mice (Kempermann et al., 1997). The range of ChR2⁺ GCs activated by light during *in vivo* experiments was estimated considering the geometrical properties of the light cone emitted through the optical fiber. The numerical aperture of the fiber (0.22) and the refraction index of the gray matter (1.36; Aravanis et al., 2007) allowed the calculation of the angle of divergence of the cone. Thus, we estimated that for a distance ranging from 200 to 400 μ m (height of the cone) from the fiber tip we could find 4–31 cells. At these distances from the fiber tip, we had power attenuations (3 mW was the power measured at the fiber tip outside the brain) of 0.39 and 0.23, respectively (<http://web.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>).

To recover the morphology of neurons filled with biocytin during *in vivo* whole-cell patch-clamp recordings, brains were removed after the completion of electrophysiology experiments and were fixed for 1 week at 4°C in a solution containing 4% PFA in 1 $\times$ PBS, pH 7.4. Coronal slices (100 μ m thick) were washed three times with 0.3% Triton X-100 in 1 $\times$ PBS (20 min each) and incubated overnight at 4°C in 1:1000 Alexa Fluor 488 or 555 streptavidin conjugated in the same solution. In between all experimental procedures, slices were washed with 1 $\times$ PBS. We successfully recovered the morphology of CA3 hippocampal neurons in 20 of 26 neurons. Immunofluorescence of mounted coverslips was acquired with a spinning disk microscope (model DMI6000, Leica Microsystems) equipped with a confocal Scanner Unit CSU-X1 (Yokogawa) using an HC PL Fluotar 10 $\times$ dry objective with NA of 0.3, an HCX PL Apo 40 $\times$ oil objective with NA of 1.25, an HCX PL Apo CS 63 $\times$ oil objective with NA of 1.4, and an HCX PL Apo 100 $\times$ oil objectives with NA 1.4, and an Evolve EMCCD camera (Photometrics) or an HQ2 CCD camera (Photometrics). The diode lasers used were at 408, 491, and 561 nm. The z-stacks were performed with a galvanometric stage (Leica Microsystems). The 37°C atmosphere was created with an incubator box and an air heating system (Life Imaging Services). This system was controlled by MetaMorph software (Molecular Devices). High-resolution stacks were generated using ImageJ software.

Drugs. The following drugs were used: CGP55845, gabazine (Tocris Bioscience). Aliquots of stock solutions were prepared and frozen at -20°C . All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Statistical analysis. Values are given as the mean $\pm$ SEM of n experiments. Significance of differences was assessed by Student's paired or unpaired t test and ANOVA, as indicated. A Mann–Whitney test was used for comparison of two groups, and a Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's multiple-comparison test for comparison was used for comparison of more than two groups. Within-cell comparisons were made with a Wilcoxon matched pairs test in raw non-normalized values between baseline values and values obtained after applying the stimulation protocol. Statistical differences were considered as significant at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

Results

Light-induced short-term plasticity at mf–CA3 synapses in slices and *in vivo*

We delivered an adeno-associated viral vector encoding the ChR2 variant H134R-EYFP in the DG of POMC-Cre mice (Fig. 1A; Atasoy et al., 2008). Histological inspection revealed expression of EYFP in a restricted population of GCs over the entire width of the DG GC layer and not in other hippocampal cell types (Fig. 1A). We estimated that $4.5 \pm 1.1\%$ of the total number of DG GCs expressed ChR2-EYFP (see Materials and Methods). We then prepared slices to compare the intrinsic membrane properties of uninfected GCs (EYFP[−]), GCs infected with a control EYFP virus (EYFP⁺), and GCs infected with ChR2-EYFP

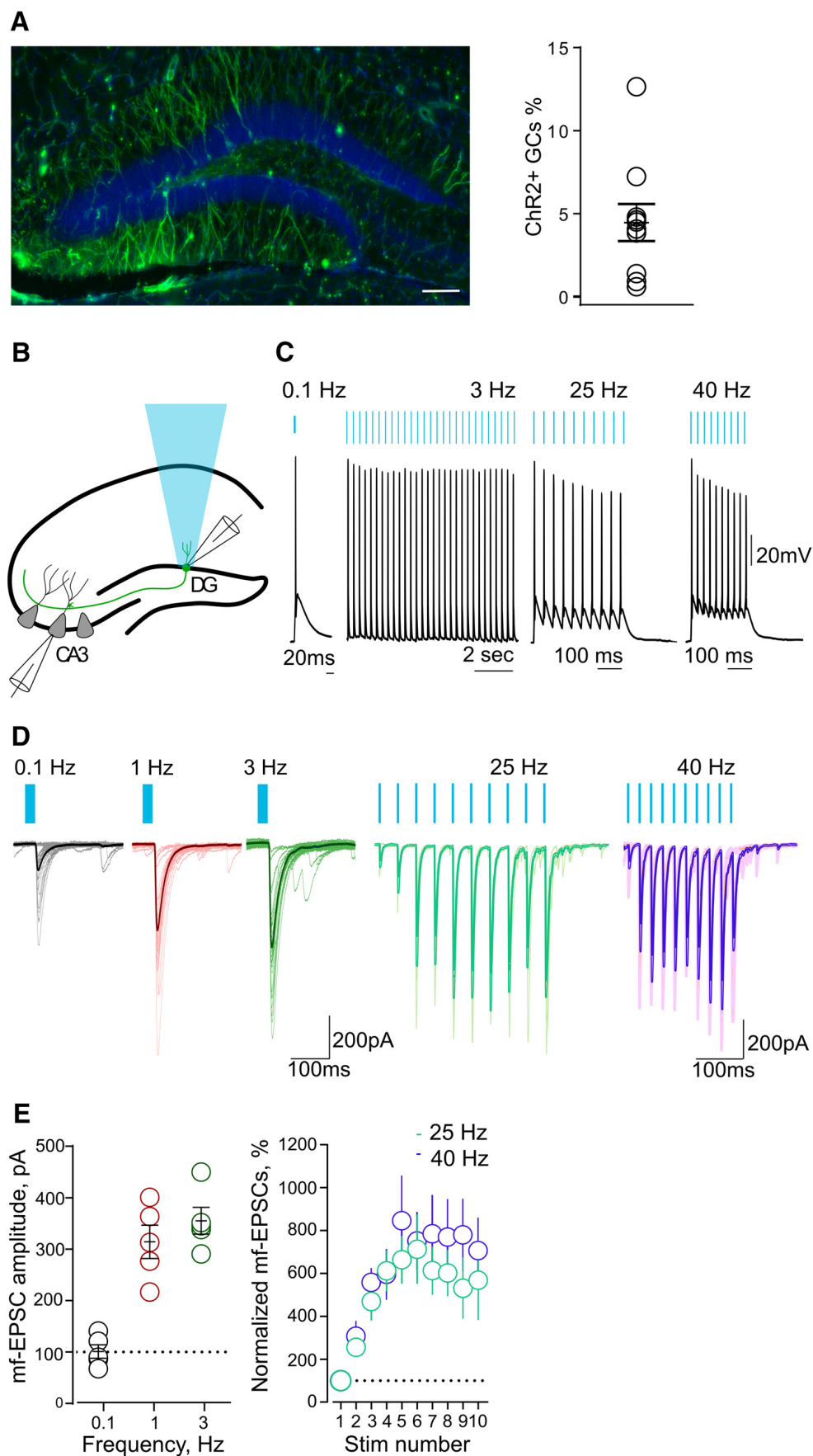


Figure 1. Light-induced short-term plasticity at mf–CA3 synapses in slices. **A**, Confocal fluorescent image (left) illustrating ChR2-EYFP expression in GCs of the DG. Scale bar, 100 μ m. On the right, a summary plot shows the percentage of GCs expressing ChR2-EYFP (right; $n = 10$ mice). **B**, Schematic illustration of the hippocampus for experimental settings during optical stimulation of GCs in acute slices. **C**, Current-clamp recordings showing DG cell firing in response to patterned blue light (0.1–40 Hz). Blue bars indicate light stimulation. (Figure legend continues.)

Table 1. Passive and active properties of POMC GCs

	EYFP [−]	EYFP ⁺	Chr2 ⁺ –EYFP
RMP (mV)	71.6 ± 1.4 (15)	69.8 ± 1.7 (9)	62.4 ± 2.8 (9)*
Input resistance (MΩ)	584 ± 40 (14)	440 ± 52 (7)	503 ± 55 (8)
Spontaneous AP frequency (Hz)	0 (14)	0 (7)	0 (8)
AP voltage threshold (mV)	46.4 ± 0.7 (14)	47.4 ± 1.1 (11)	44.8 ± 1.3 mV (8)

Values are reported as the mean ± SEM; values in parentheses indicate the number of cells.

*Significance based on one-way ANOVA (see Materials and Methods).

(Chr2⁺ GCs; Table 1). No difference was observed among EYFP[−], EYFP⁺, and Chr2⁺ GCs in input resistance. Resting membrane potential was similar in EYFP[−] and EYFP⁺ GCs. Chr2⁺ GCs showed a more depolarized resting membrane potential in comparison with EYFP[−] GCs. However, in the absence of stimulation, GCs from both groups did not fire a single action potential in resting conditions, and we did not find any difference in the threshold for action potential generation during 1 s current pulses. These results strongly suggest that POMC GCs represent a subpopulation of GCs with electrophysiological properties of mature DG neurons (Schmidt-Hieber et al., 2004). Brief pulses (5 ms, 470 nm) of light at frequencies from 0.1 to 40 Hz reliably triggered single action potentials in Chr2⁺ GCs without any failures (Fig. 1B,C).

To examine whether classic synaptic properties of DG–CA3 connections can be elicited optogenetically, we combined light stimulation of GCs with electrophysiological recordings from single CA3 pyramidal neurons in slices. We then recorded EPSCs from CA3 PCs evoked by optogenetic stimulation of the soma of presynaptic GCs (Fig. 1B). At 0.1 Hz, mf-EPSCs had an average latency of 5.3 ± 0.8 ms (*n* = 5), an average amplitude of 101.0 ± 13.1 pA (*n* = 5), and an average percentage of failures of 18.0 ± 3.3% (*n* = 5). These values are in the range of *in vitro* measurements obtained with minimal electrical stimulation (Marchal and Mulle, 2004), suggesting that with this viral infection rate mf-EPSCs was evoked by light stimulation rather than from one or a few GCs. Increasing the stimulation frequency from 0.1 to 1–3 Hz induced a significant facilitation of mf-EPSC amplitude (*p* = 0.0082, one-way ANOVA; Fig. 1D,E). Bursts of light stimulation consisting of short trains at 25 and 40 Hz also induced a robust increase in the amplitude of mf-CA3 EPSCs over the course of the train (25 Hz: *p* = 0.0023, one-way ANOVA; 40 Hz: *p* = 0.033; Fig. 1D,E). Hence, light activation of Chr2⁺ GCs faithfully evoked mf-CA3 synaptic responses over a wide range of frequencies, with properties of short-term synaptic plasticity comparable to those obtained with electrical stimulation in slice recordings (Nicoll and Schmitz, 2005).

As a first evaluation of synaptic properties of DG–CA3 connections *in vivo*, we recorded field postsynaptic potentials above the CA3 pyramidal layer (Fig. 2A–C). An optical fiber was placed above the GC layer of the DG in anesthetized mice to deliver light stimulation (see Materials and Methods; Fig. 2A). Light was delivered at low frequency (0.05 Hz) to measure basal transmission, and then switched to higher frequencies (1, 3, and 10 Hz; Fig. 2B,D). This protocol produced a marked potentiation of fEPSPs, the early excitatory component of the response (percentage of

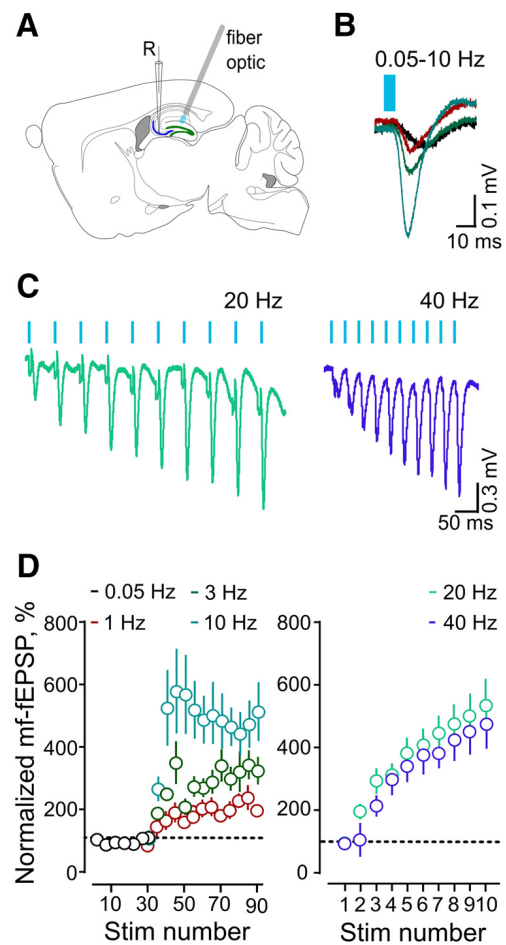


Figure 2. *In vivo* characterization of mf-CA3 synaptic responses. **A**, Scheme showing the placement of fiber-optic and recording electrodes (R) for fEPSP. **B**, Representative fEPSP average traces obtained with optical stimulation at 0.05–10 Hz (*n* = 8). **C**, Representative fEPSP average traces obtained with five trains of optical stimulation at 20 Hz (*n* = 14) and 40 Hz (*n* = 12). **D**, Averaged time courses for the normalized fEPSPs slopes shown in **B** (left) and **C** (right).

fEPSP slopes vs baseline: at 0.05 Hz, 1 Hz: 107 ± 10%; at 3 Hz: 280 ± 30%; at 10 Hz: 480 ± 90%; *n* = 8, *p* = 0.0061, one-way ANOVA). Similarly, a gradual and robust facilitation of fEPSPs was observed when light stimulation was delivered in trains [percentage of fEPSP slope: 10th vs 1st stimulation: 20 Hz, 501 ± 80 (*n* = 14, *p* = 0.0001); 10th vs 1st stimulation: 40 Hz (470 ± 90, *n* = 12, *p* = 0.0005, Wilcoxon matched-pairs test); Fig. 2C,D]. These results indicate that both tonic and train firing patterns result in facilitation of mf-CA3 transmission *in vivo* as described previously with bulk electrical stimulation protocols (Klausnitzer and Manahan-Vaughan, 2008; Hagen and Manahan-Vaughan, 2010).

Light stimulation of GCs induces a slow hyperpolarization in CA3 PCs *in vivo*

To study the properties of synaptic transmission at DG–CA3 connections at a single-cell level *in vivo*, we turned to patch-clamp recordings. We first investigated the electrophysiological properties of single GCs and CA3 PCs *in vivo* (Fig. 3), which were identified morphologically following the recovery of biocytin-filled cells (Fig. 3A,C). In the absence of stimulation, GCs showed hyperpolarized resting membrane potentials alternating with frequent periods of depolarization and did not fire spontaneously (Fig. 3A,B), which is in agreement with recent studies *in vivo* (Pernía-Andrade and Jonas, 2014; Kowalski et al., 2016). Spike

←

(Figure legend continued.) **D**, Representative traces of 30 consecutive mf-EPSCs evoked at 0.1–3 Hz. Averaged traces are superimposed (left). Representative traces of mf-EPSCs evoked with trains of light stimulation at 25 and 40 Hz. Averaged traces are superimposed (right). **E**, Summary graph of averaged mf-EPSCs amplitude (*n* = 5) evoked at 0.1–3 Hz (left). Averaged time courses (*n* = 5) for the normalized mf-EPSCs amplitude evoked at 25 and 40 Hz (right).

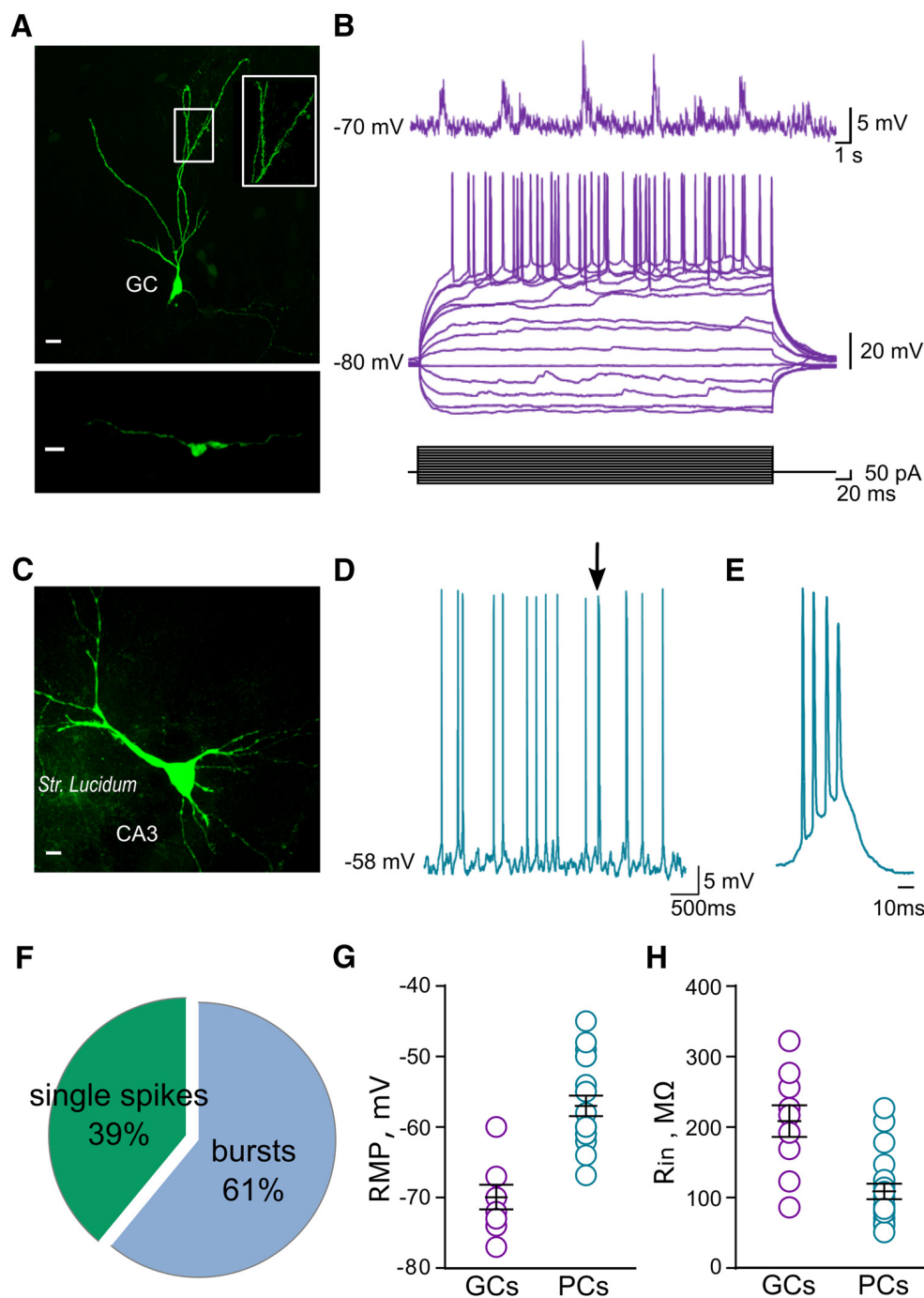


Figure 3. Electrophysiological characterization of GCs and CA3 PCs *in vivo*. **A**, Confocal fluorescent image of a DG cell filled with biocytin during whole-cell recording and visualized by *post hoc* labeling with Alexa Fluor 488. Scale bar, 10 μ m. Dendritic spines from the same cells are plotted at higher magnification. Inset scale bar, 20 μ m. The bottom part shows a mossy fiber bouton from the same DG cell in stratum lucidum. Scale bar, 5 μ m. **B**, Example trace of a current-clamp recording from a DG cell showing lack of spontaneous firing, membrane potential oscillations (top), and subthreshold and suprathreshold responses to injected current pulses (bottom). **C**, Confocal fluorescent image of a CA3 PC filled with biocytin during whole-cell recording and visualized by *post hoc* labeling with Alexa Fluor 488. Scale bar, 10 μ m. **D**, Example trace of a current-clamp recording from a CA3 PC showing spontaneous single and bursts of action potentials (arrow). **E**, Example of burst of action potentials obtained from traces shown in **D**. **F**, Pie chart showing the proportion of single action potentials vs bursts in CA3 PCs. **G**, Scatter plot graph summarizing resting membrane potential (left) and (**H**) input resistance (right) of GCs ($n = 12$) and CA3 PCs ($n = 20$).

discharge could, however, be triggered by positive current steps (Fig. 3B). CA3 PCs were characterized by low spontaneous firing frequency (2 ± 0.38 Hz; $n = 11$), which consisted of both single spikes and bursts of action potentials (single APs, $38.9 \pm 9.4\%$; bursts, $61.1 \pm 9.4\%$; $n = 11$; Fig. 3D–F). CA3 PCs displayed a more depolarized membrane potential compared with GCs [-57 ± 1.3 mV ($n = 20$) vs -70.3 ± 1.6 mV ($n = 9$), respectively] and lower input resistance [108.8 ± 10.9 M Ω ($n = 20$) vs 209 ± 22 M Ω ($n = 9$); Fig. 3G,H].

We then characterized mf–CA3 synaptic responses *in vivo* from CA3 PCs in the patch-clamp, current-clamp configuration (Fig. 4). In addition to direct excitation of CA3 PCs, GCs also provide excitatory synaptic inputs to CA3 INs via filopodia extensions of the mf bouton and en passant synapses (Fig. 4A). Accordingly, light stimulation of DG cells generated a biphasic synaptic response in CA3 PCs, which was shaped by stimulation frequency (Fig. 4C,D). At low stimulation frequency (0.05 Hz), mf–CA3 synaptic responses consisted of pre-

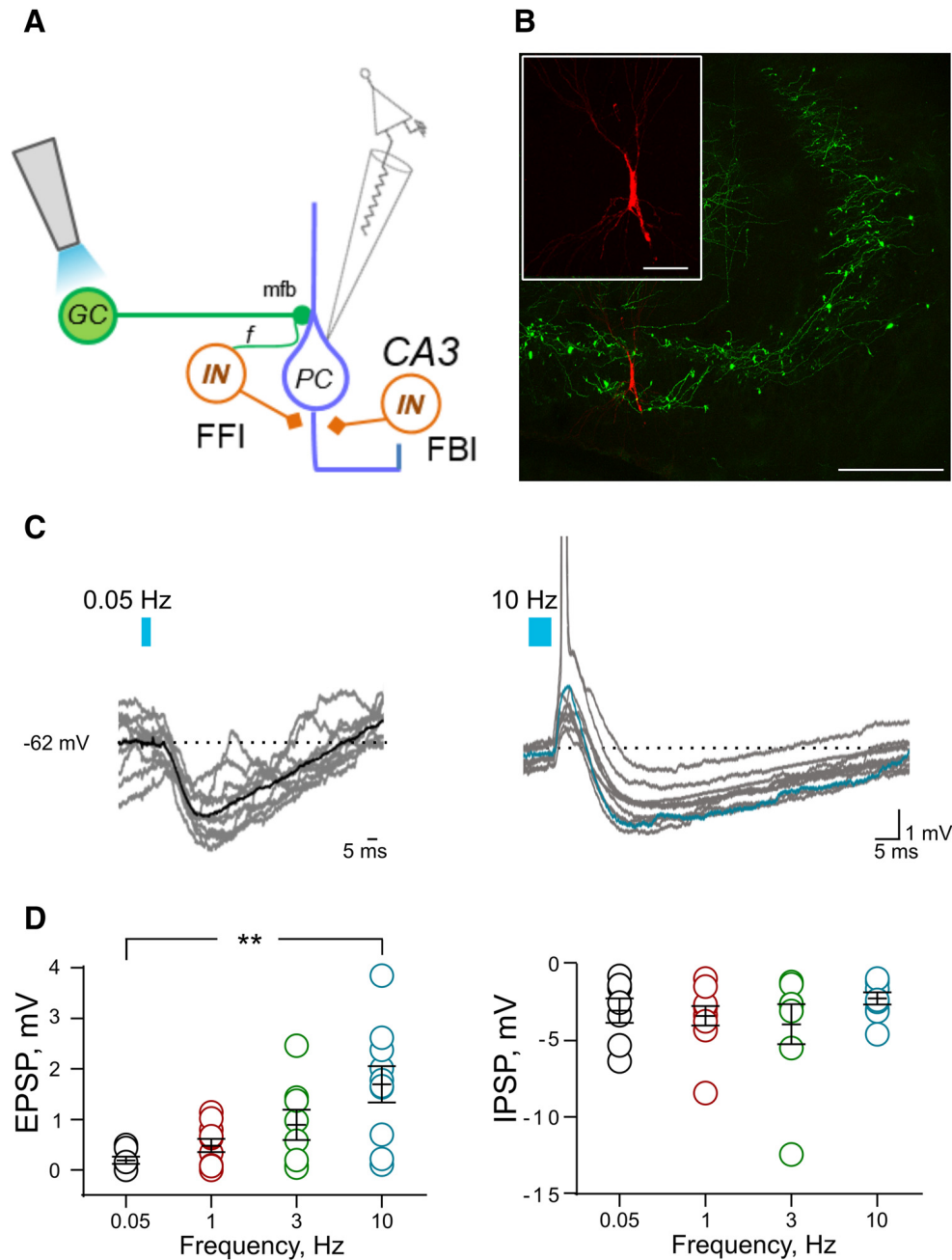


Figure 4. Light stimulation of GCs induces a slow hyperpolarization in CA3 PCs *in vivo*. **A**, Schematic representation of the hippocampal CA3 microcircuit, showing the experimental configuration for light stimulation and recording site. **B**, Confocal fluorescent image showing ChR2 expression in mfs in the stratum lucidum (EYFP) and a CA3 PC filled with biocytin in whole-cell recording (Alexa Fluor 555). Scale bar, 100 μ m. The inset shows the same CA3 neuron at higher magnification. Scale bar, 20 μ m. **C**, Synaptic potentials evoked with increasing frequencies of optical stimulation of GCs. Representative traces of 10 consecutive responses evoked at 0.05 Hz (left) and 10 Hz (right) are shown (spikes appear truncated). Averaged traces obtained from subthreshold synaptic responses are superimposed. **D**, Scatter plot showing frequency-dependent facilitation of light-evoked mf–EPSP amplitude (left) and stable light-evoked mf–IPSP amplitude (right).

dominantly of an IPSP, and in most instances EPSPs could not be detected (Fig. 4C). The mf–CA3 EPSPs became apparent upon increasing the frequency of stimulation, which produced a gradual facilitation of mf–CA3 EPSP amplitudes (0.05 Hz, 0.18 ± 0.07 mV; 1 Hz, 0.48 ± 0.13 mV; 3 Hz, 0.89 ± 0.29 mV; 10 Hz, 1.69 ± 0.36 mV; $n = 7$ –10; Fig. 4C,D). Increasing stimulation frequency resulted in an increase in the probability of spike discharge (Fig. 4C; 0.05 vs 10 Hz; $**p < 0.0075$, Dunn’s multiple-comparison test). In contrast with the excitatory component of the response, the IPSP that followed mf–CA3 EPSPs were not significantly affected by changes in frequencies (0.05 Hz, -2.98 ± 0.79 mV; 1 Hz, -3.32 ± 0.64

mV; 3 Hz, -3.87 ± 1.3 mV; 10 Hz, -2.19 ± 0.39 mV; $n = 7$ –10; Fig. 4D). The inhibitory response was characterized by its long duration (at 1 Hz, 119.1 ± 14.6 ms; $n = 10$). The duration of the inhibitory response did not significantly differ when changing the frequency of light stimulation [0.05 Hz, 105.8 ± 14.9 ms; 1 Hz, 119.1 ± 14.6 ms; 3 Hz, 115.3 ± 12.7 ms; 10 Hz, 88.7 ± 4.8 ms ($p = 0.4732$, one-way ANOVA)]. This is a first description of subthreshold synaptic transmission at mf–CA3 synapses *in vivo*. It clearly indicates that GCs elicit synaptic inhibition which lasts on the order of 100 ms whatever the presynaptic stimulation rate (within the 0.05–10 Hz range). In contrast, increased stimulation frequency results in

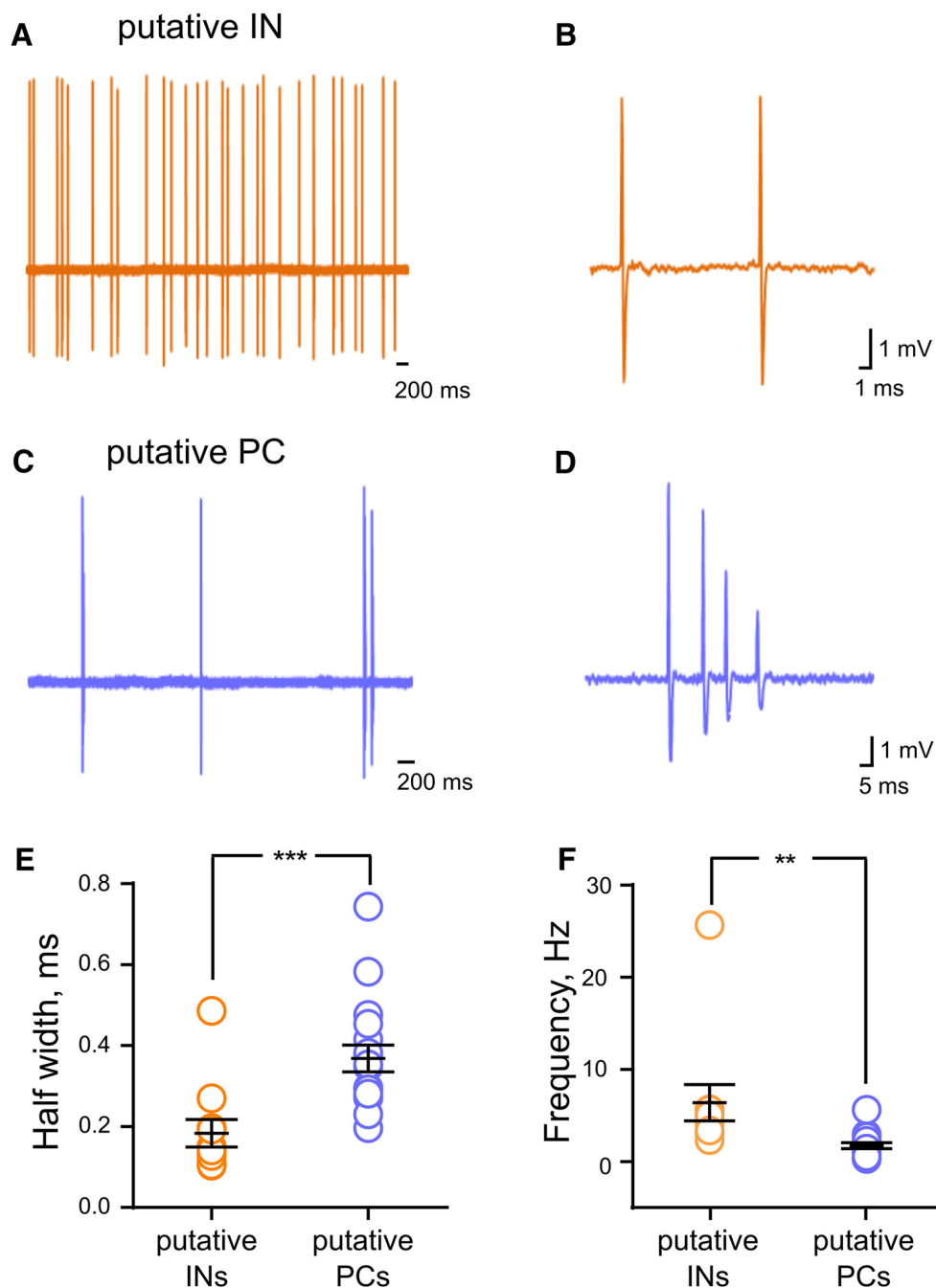


Figure 5. Characterization of CA3 neurons firing *in vivo* with juxtacellular recordings. **A**, Representative high-pass-filtered (100 Hz) spike traces recorded from a putative CA3 IN. **B**, Trace illustrating the action potential shape from the same cell in **A**. **C**, Representative high-pass-filtered (100 Hz) spike traces recorded from a putative CA3 PC. **D**, Trace showing a typical burst of action potential from the same cell in **C**. **E**, Scatter plot graph showing average half-width of the action potentials recorded from putative CA3 INs (orange) and putative CA3 PCs (violet). **F**, Scatter plot graph showing the average spontaneous frequency of action potentials recorded from putative INs (orange, $n = 11$) and putative PCs (violet, $n = 17$).

short-term facilitation of mf–CA3 EPSPs, hence in gradual amplification of excitation with regard to inhibition.

Activation of the local feedforward circuit controls CA3 excitability *in vivo*

We further investigated the role of local INs in shaping the spiking output of CA3 neurons. In juxtacellular recordings, two populations of neurons could clearly be distinguished on the basis of spontaneous firing frequency, firing mode, and spike waveform, which corresponded to populations of putative INs and putative PCs (Csicsvari et al., 1999). CA3 INs preferentially fired single action potentials (Fig. 5*A,B*), whereas CA3 PCs fired in a mixed

mode with single action potentials and short bursts (Fig. 5*C,D*). CA3 INs had a significantly higher mean firing rate [INs, 6.4 ± 2 ($n = 11$); PCs, 1.73 ± 0.3 Hz ($n = 17$); $**p = 0.007$, unpaired t test] and narrower spikes [INs, 0.18 ± 0.03 ms half-width ($n = 11$); PCs, 0.37 ± 0.03 ms half-width ($n = 17$); $***p = 0.001$, unpaired t test; Fig. 5*E,F*]. No difference was observed in the half-width and spontaneous firing frequency of CA3 PCs recorded in isoflurane anesthetized mice and those recorded under ketamine/xylazine anesthesia [half-width: 0.37 ± 0.03 $n = 17$ vs 0.4 ± 0.02 ($n = 8$); $p = 0.47$, unpaired t test]; frequency: 4.16 ± 0.6 Hz ($n = 17$) vs 3.81 ± 0.9 ($n = 8$), $p = 0.77$, unpaired t test]. We then examined the impact of the optical stimulation of GCs on

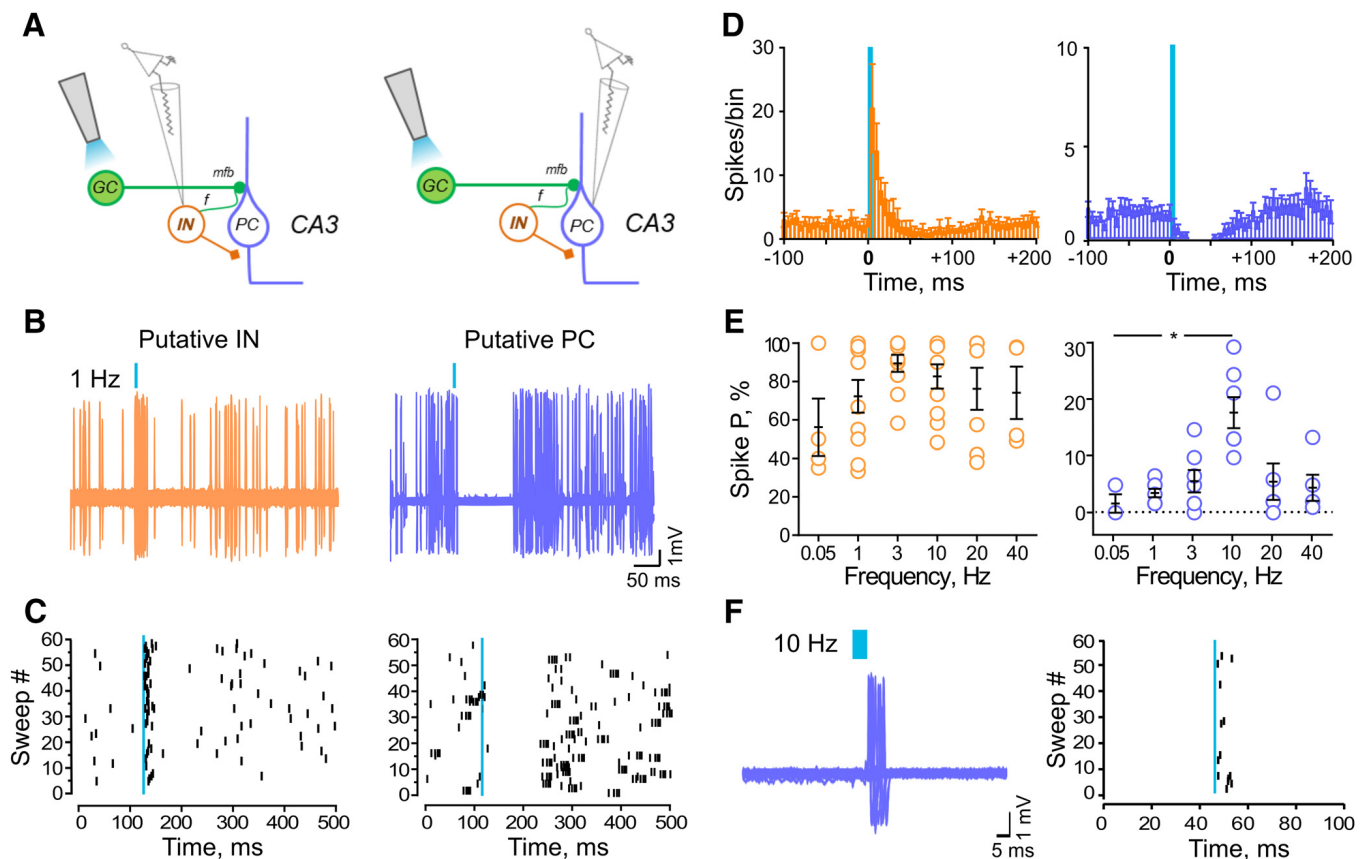


Figure 6. DG cell stimulation reliably activates INs driving feedforward inhibition in CA3 PCs *in vivo*. **A**, Schematic representation of the hippocampal CA3 microcircuit, showing fiber-optic placement for light stimulation of presynaptic GCs and postsynaptic recording site of CA3 INs (left) or CA3 PCs (right). **B**, Light stimulation of GCs at 1 Hz reliably discharges putative CA3 INs (left) and induces firing inhibition in CA3 PCs (right). **C**, Raster plot obtained from the representative traces shown in **B**. **D**, Cumulative perievent time histogram showing the average number of spikes per bin (bin size, 5 ms) in CA3 INs (left, $n = 10$) and PCs (right, $n = 14$) before and after 1 Hz light stimulation of GCs. **E**, Spike probability (P), measured within 30 ms interval from the beginning of the light pulse (dashed line) at different frequencies. Scatter plot graph (left) showing a significant increase in spike probability in INs ($n = 10$). The spike probability of the INs is not affected by the frequency of stimulation. Scatter plot graph (right) showing a significant increase in spike probability in CA3 PCs ($n = 7$) following 10 Hz stimulation. **F**, The 10 Hz light stimulation of GCs reliably discharges CA3 PCs (left). Raster plot obtained from the representative traces shown in **F**.

the firing of putative CA3 INs and PCs (Fig. 6A). In CA3 PCs, light stimulation at 1 Hz induced a strong inhibition of spontaneous firing (Fig. 6B–D). A subpopulation of CA3 PCs was not affected by light stimulation (data not shown), which is in agreement with the sparse anatomical connections of mf–CA3 PCs (Henze et al., 2000; Nicoll and Schmitz, 2005; Evstratova and Tóth, 2014) and the low percentage of GC cells expressing ChR2 (Fig. 1A). Repetitive pulses of light at 1 Hz reliably discharged CA3 INs, and 6 of 10 CA3 INs consistently showed multiple spikes; increasing the frequency of stimulation did not change the spike probability (Fig. 6E). In contrast, stimulation at 10 Hz increased the probability of action potential discharge in 7 of 14 CA3 PCs (Fig. 6E, F). The spike probability response in CA3 PCs was significantly different between 0.05 and 10 Hz [0.05 Hz, $1.7 \pm 1.7\%$ ($n = 4$); 1 Hz, $3.6 \pm 0.8\%$ ($n = 7$); 3 Hz, $5.7 \pm 2\%$ ($n = 7$); 10 Hz, $18.1 \pm 2.8\%$ ($n = 7$); 20 Hz, $5.6 \pm 3.3\%$ ($n = 5$); 40 Hz, $4.5 \pm 2.4\%$ ($n = 6$); $*p < 0.014$, one-way ANOVA; Fig. 6E]. Increasing presynaptic stimulation frequency also resulted in a significantly shorter duration of light-driven inhibition (1 Hz, 98.2 ± 11 ms; 10 Hz, 65.4 ± 5.6 ms; $n = 14$; $**p = 0.004$, paired t test). Both populations of neurons, when firing, discharged with a fixed latency [CA3 PCs, 6.8 ± 1.6 ms ($n = 7$); CA3 INs, 7.2 ± 0.9 ms ($n = 12$)], thus providing evidence for monosynaptic connections between GCs and their postsynaptic targets.

Involvement of both GABA_A and GABA_B receptors in feedforward inhibition *in vivo*

The results described above demonstrate that activation of a feedforward inhibitory circuit provides a robust inhibition, which tightly controls spike transmission of DG–CA3 PCs *in vivo*. DG-driven feedforward inhibition characterized in slices triggers a disynaptic IPSC in CA3 PCs carried by GABA_A receptors (Torbjörn et al., 2010). We thus checked the involvement of GABA_A receptors in the inhibition of CA3 PCs firing in response to optical stimulation of GCs *in vivo* (Fig. 7). Local application of the specific GABA_A antagonist gabazine (500 μ M) significantly increased the firing probability in response to GCs stimulation at 1 Hz (control, $2.7 \pm 0.7\%$; gabazine, $34.8 \pm 4\%$; $n = 8$; $**p = 0.008$, Wilcoxon matched pairs signed rank test; Fig. 7A, B). In the presence of gabazine, all CA3 PCs discharged single spikes or bursts of action potentials following light stimulation.

These results indicate that the initial phase of feedforward inhibition is mediated by the activation of GABA_A receptors, which curtail phase-locked spike transfer. However, gabazine did not affect the duration of inhibition induced by optical stimulation of GCs (control, 78 ± 4 ms; gabazine, 105 ± 14 ms; $n = 8$; $p = 0.09$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test; Fig. 7A, B), which is consistent with the observation that the duration of DG-driven inhibition likely exceeds typical IPSCs generated by

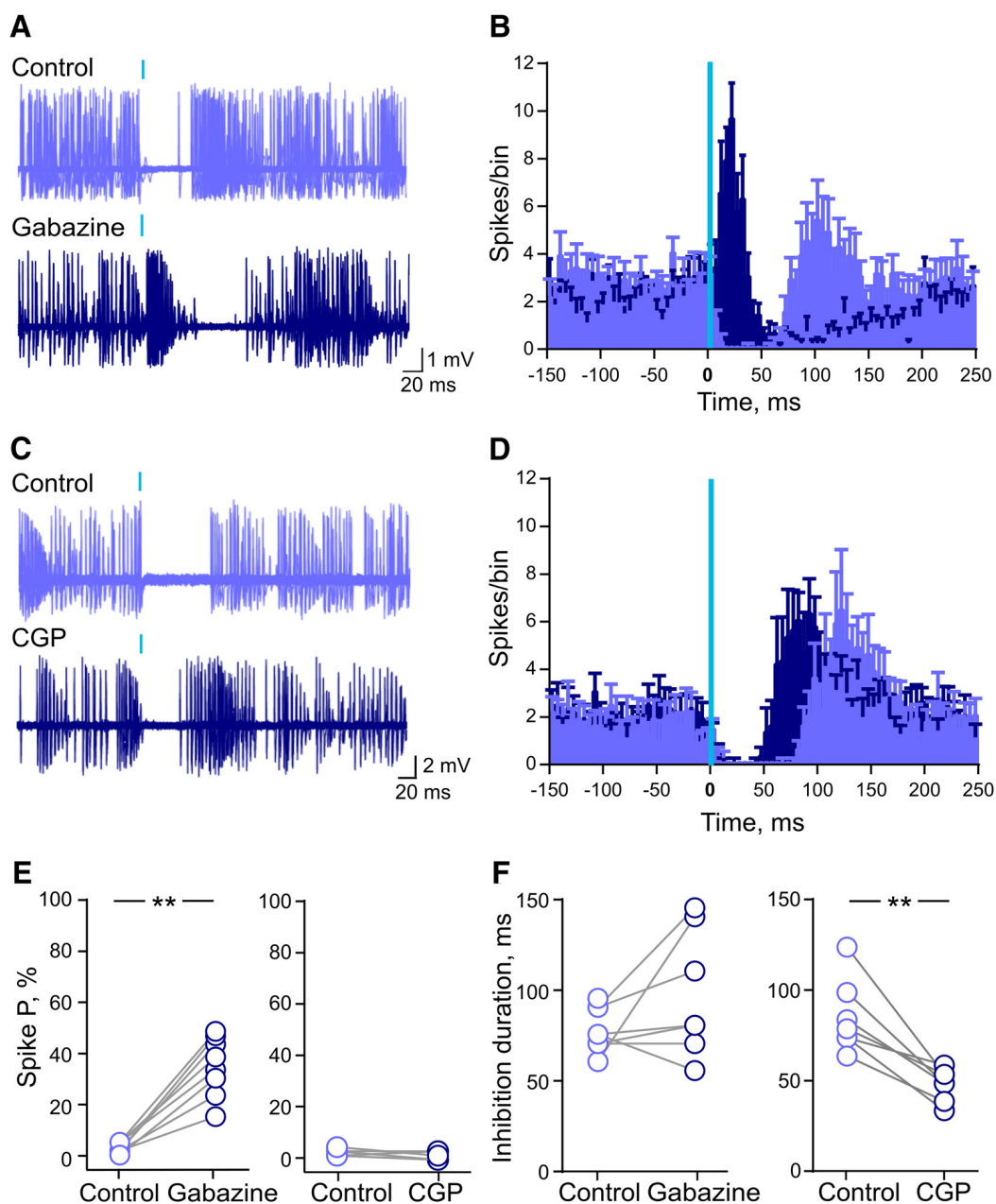


Figure 7. Involvement of both GABA_A and GABA_B receptors in feedforward inhibition *in vivo*. **A**, Superimposed traces obtained from a putative CA3 PC (up) showing light-induced firing inhibition in a control condition and after local application of gabazine 500 μ M (bottom). **B**, Cumulative perievent time histogram showing the average number of spikes per bin (bin size, 5 ms) in the control condition (violet) and after gabazine application (blue, $n = 8$). **C**, Superimposed traces obtained from a putative CA3 PC (up) showing light-induced firing inhibition in control condition and after local application of CGP55845 500 μ M (bottom). **D**, Cumulative perievent time histogram showing the average number of spikes per bin (bin size, 5 ms) in the control condition (violet) and after CGP55845 application (blue, $n = 7$). **E**, Scatter plot graph showing changes in mf-driven spike probability after gabazine (left, $n = 8$) and CGP55845 (right, $n = 7$) application. **F**, Scatter plot graph showing the duration of inhibition after gabazine (left, $n = 8$) and CGP55845 (right, $n = 7$) application.

GABA_A receptors (on the order of 30 ms (Torborg et al., 2010)). We thus examined the involvement of GABA_B receptors in DG-driven feedforward inhibition of spike transfer in CA3 PCs. Local application of the specific GABA_B antagonist CGP55845 (500 μ M) significantly reduced the slow inhibition in CA3 PCs during 1 Hz stimulation (control, 86 ± 7.6 ms; CGP55845, 49 ± 3.3 ms; $n = 7$; $**p = 0.008$, Wilcoxon matched pairs signed rank test; Fig. 7C–F). This strongly suggests that the late phase of the IPSP recorded in the current-clamp mode is mediated by the activation of GABA_B receptors. CGP55845 application did not affect spontaneous firing or the initial spike discharge (within 30 ms from the beginning of the light pulse; control, $2.6 \pm 0.5\%$; CGP55845, $1.7 \pm 0.6\%$; $n = 7$; $p = 0.12$, Wilcoxon matched pairs

signed rank test) evoked by light stimulation of DG GCs (Fig. 7E). Altogether, our data demonstrate how the intact CA3 circuit feedforward inhibition driven by GCs triggers both a rapid inhibition mediated by GABA_A receptors and a slow inhibition mediated by GABA_B receptors, which sets the temporal rules for spike transfer at DG–CA3 connections.

Discussion

Our work extends from the extensive studies of mf–CA3 synapses in rodent slice recordings (Henze et al., 2000; Nicoll and Schmitz, 2005; McBain, 2008; Sachidhanandam et al., 2009) to the intact brain *in vivo* and directly characterizes synaptic transmission at DG–CA3 connections. In slices, the amplitude of mf synaptic currents in CA3

PCs is highly conditioned by the pattern of presynaptic activity (Henze et al., 2002; Nicoll and Schmitz, 2005). At a low frequency of presynaptic GC activity (<0.1 Hz), mf-EPSPs do not trigger action potential discharge because of a very low release probability at individual release sites ($p < 0.01$; Nicoll and Schmitz, 2005; Lanore et al., 2012; Evstratova and Tóth, 2014; Cherubini and Miles, 2015). However, postsynaptic action potentials are triggered in slice recordings with repeated presynaptic activity (Henze et al., 2002; Klausnitzer and Manahan-Vaughan, 2008; Sachidhanandam et al., 2009). This is a consequence of the wide dynamic range of presynaptic short-term plasticity upon repeated stimulation (Salin et al., 1996; Sachidhanandam et al., 2009) combined with a large number of release sites, a large vesicle pool size, and multivesicular release (Margrie et al., 2002; Hallermann et al., 2003; Lee et al., 2009; Chamberland et al., 2014). To date, very little is known about the properties of short-term plasticity at mf–CA3 synapses *in vivo*. Frequency facilitation, a tonic form of plasticity, leads to increased magnitude of fEPSPs in CA3 elicited by low-frequency electrical stimulation of the DG (1–2 Hz) in freely behaving rats (Georges and Aston-Jones, 2002; Klausnitzer and Manahan-Vaughan, 2008). However, in these conditions, paired-pulse facilitation of fEPSPs is weak and is observed only for an interstimulus interval of 50 ms (Atasoy et al., 2008; Hagena and Manahan-Vaughan, 2010), in stark contrast with slice recordings (Schmidt-Hieber et al., 2004; Nicoll and Schmitz, 2005), even in fully developed hippocampus, such as what is described here (mice >6 weeks old). Frequency facilitation of fEPSPs evoked by light activation of DG cells was apparent *in vivo* when shifting the frequency from 0.05 to 1 Hz, although it appeared somewhat attenuated compared with slice recordings, in which a fourfold fivefold amplitude increase can be observed for the same frequency range. The lower extracellular calcium concentration *in vivo* may contribute to the difference in release probability and short-term plasticity (Lortie et al., 2009). Strong facilitation of information transfer between the DG and CA3 PCs occurs *in vivo* only with high frequencies of presynaptic GCs activity (Henze et al., 2002), but the underlying synaptic mechanisms have not been investigated yet.

Here we characterized the properties of mf–CA3 synaptic transmission using whole-cell current-clamp recordings of CA3 PCs *in vivo*. Feedforward inhibition appears to play a major role in controlling information transfer at DG–CA3 connections *in vivo*. Optical stimulation of GCs triggers a robust slow inhibition (in the 100 ms range) in single CA3 PCs recorded in the current-clamp mode. At a low frequency of GC activity (1–3 Hz), the mf–CA3 EPSP is either absent or blunted by disynaptic inhibition. The gradual increase in the frequency of stimulation induces a significant facilitation of mf–CA3 EPSPs, with the amplitude and duration of IPSPs remaining unchanged. Accordingly, juxtacellular recordings from putative CA3 INs indicate that spike transfer at connections between the DG and CA3 INs is already very efficient at low presynaptic stimulation frequency and appears insensitive to increased frequency of GCs activity over a wide range, from 0.05 to 40 Hz. Thus, short-term facilitation of mf–CA3 PC EPSPs combined with the stable discharge of CA3–IN synapses leads to a progressive increase in the excitation/inhibition balance. We observed optimal spike transfer at mf–CA3 PC synapses with a frequency of stimulation of 10 Hz. This can be explained by the ~ 100 -ms-long inhibition observed in CA3 PCs following a single stimulation of GCs. Inhibition during this time window likely prevents spike discharge for intervals between presynaptic spikes of <100 ms (e.g., at 20 and 40 Hz) even though mf–CA3 EPSPs are facilitated by short-term plasticity. Previous work has shown that the probability of spike transfer at mf–CA3 synapses steadily increases with frequency from 10 to 100 Hz (Henze et al., 2002). Our results differ somewhat from this previous study, al-

though the reliability of optogenetics for precisely triggering action potentials above frequencies of 40 Hz prevented the testing of the same range of frequencies. In our experimental conditions, spike transfer at mf–CA3 IN synapses is very efficient, and the slow mf-driven inhibition induced in CA3 PCs is consistent with a refractory period for spike transfer corresponding to the 100 ms inhibition following DG stimulation.

Optogenetic stimulation of DG cells represents a clear advantage over bulk electrical stimulation in terms of cellular specificity. However, optogenetic stimulation does not avoid activating several presynaptic neurons in a time-locked manner, a situation that may not correspond to the physiological firing activity of DG cells. It was thus important to estimate the number of GCs that could be activated simultaneously by light. In the POMC-Cre mouse line used here, Cre is expressed in only <15 – 20% of DG GCs (E. Normand, unpublished observations). We directly estimated the percentage of ChR2⁺ GCs to 4.5% of the total of DG cells. Our optical fiber (200 μm in diameter) positioned ~ 200 μm above the DG cell layer generated a light cone of 0.001 – 0.0076 mm^3 at 200 μm (GC dendritic layer) to 400 μm (GC somatic layer) from the fiber tip. This represents an estimated 4–31 DG GCs that can possibly be activated by a pulse of light (see Materials and Methods). Our experimental conditions to study the impact of DG GCs firing onto the CA3 microcircuit are thus compatible with the sparse action potential discharges of GCs observed in awake mice (Jung and McNaughton, 1993; Pernía-Andrade and Jonas, 2014). The robust inhibition triggered by light stimulation of DG GCs is likely attributed to feedforward inhibition (the same mf making synapses onto a given CA3 PC and onto CA3 INs that directly inhibit this same CA3 PC (Mori et al., 2007)). Although we provide evidence that light activates only a limited number of DG GCs simultaneously in our experimental conditions, this potentially differs from previous experiments in organotypic cultures (Mori et al., 2004) and *in vivo* (Henze et al., 2002) in which a single presynaptic DG GC was activated. Therefore, we cannot exclude that the 100 ms time window of inhibition and the underlying GABA_B receptor activation observed may be explained by the simultaneous activation of several mfs. Indeed, light stimulation of DG GCs may also activate CA3 INs, which then synapse onto a CA3 PC not being contacted by the same mf (a form of lateral inhibition).

Among the range of frequencies tested in our conditions, 10 Hz seems to be the optimized frequency of DG cell activity for spike transmission at DG–CA3 connections. Hence, our data suggest that EC incoming inputs to DG in the theta frequency range would be faithfully transmitted to CA3. It would be interesting to relate the temporal rule for spike transfer to the natural activity of DG cells during behavior. Future work should define the properties of spike transfer in awake mice, since anesthesia likely affects synaptic transmission, the duration of the feedforward inhibition, and spiking activity. It should be mentioned, however, that the spontaneous firing frequency reported here under isoflurane as well as ketamine/xylazine anesthesia is comparable to that reported with urethane anesthesia (Henze et al., 2002). Moreover, similar results for spike transfer in juxtacellular recordings of CA3 PCs were obtained under ketamine/xylazine anesthesia (data not shown). The slow inhibition (up to 100 ms) is thus a key parameter for defining the temporal rule for spike transfer at mf–CA3 PCs synapses. We found that this depended on the activation of GABA_B receptors that likely trigger the slow IPSP recorded in CA3 PCs. Interestingly, a single pulse of light triggered in the DG is capable of inducing this long-lasting inhibition in CA3 PCs even at low frequency. In the neocortex and CA1 hippocampal region, single action potentials in neurogliaform cells

elicit slow inhibition in pyramidal neurons by the activation of GABA_B receptors through their extremely dense axonal cloud (Tamás et al., 2003; Price et al., 2008). Of the four distinct GABAergic cell types contacted by mfs in CA3, ivy cells, which belong to the family of neurogliaform cells (Szabadics and Soltesz, 2009), appear as potential candidates for the extended duration of feedforward inhibition through GABA_B activation, although other GABAergic inputs could also contribute (Degro et al., 2015).

In conclusion, the efficacy of spike transfer at DG–CA3 connections *in vivo* highly depends on a strictly timed balance between the direct excitation of CA3 PCs, which shows short-term facilitation, and robust and stable feedforward inhibition composed of a fast and a slow inhibitory component. Future work should evaluate the modulation of the excitation/inhibition balance in awake behaving conditions, especially in relation to oscillations.

References

- Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, Deisseroth K (2007) An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng* 4:S143–S156. [CrossRef Medline](#)
- Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM (2008) A FLEX switch targets channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *J Neurosci* 28:7025–7030. [CrossRef Medline](#)
- Chadderton P, Margrie TW, Häusser M (2004) Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature* 428:856–860. [CrossRef Medline](#)
- Chamberland S, Evstratova A, Tóth K (2014) Interplay between synchronization of multivesicular release and recruitment of additional release sites support short-term facilitation at hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cells synapses. *J Neurosci* 34:11032–11047. [CrossRef Medline](#)
- Cherubini E, Miles R (2015) The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Front Cell Neurosci* 9:19. [CrossRef Medline](#)
- Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325:169–182. [CrossRef Medline](#)
- Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G (1999) Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat. *J Neurosci* 19:RC20. [Medline](#)
- Degro CE, Kulik A, Booker SA, Vida I (2015) Compartmental distribution of GABAB receptor-mediated currents along the somatodendritic axis of hippocampal principal cells. *Front Synaptic Neurosci* 7:6. [CrossRef Medline](#)
- Evstratova A, Tóth K (2014) Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front Cell Neurosci* 8:28. [CrossRef Medline](#)
- Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J (2007) Conditional knockout of catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* 27:14317–14325. [CrossRef Medline](#)
- Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173–5187. [Medline](#)
- Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI (2004) Ensemble dynamics of hippocampal regions ca3 and CA1. *Neuron* 44:581–584. [CrossRef Medline](#)
- Hagena H, Manahan-Vaughan D (2010) Frequency facilitation at mossy fiber–CA3 synapses of freely behaving rats contributes to the induction of persistent LTD via an adenosine-A1 receptor-regulated mechanism. *Cereb Cortex* 20:1121–1130. [CrossRef Medline](#)
- Hallermann S, Pawlu C, Jonas P, Heckmann M (2003) A large pool of releasable vesicles in a cortical glutamatergic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8975–8980. [CrossRef Medline](#)
- Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98:407–427. [CrossRef Medline](#)
- Henze DA, Wittner L, Buzsáki G (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci* 5:790–795. [CrossRef Medline](#)
- Jung MW, McNaughton BL (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3:165–182. [CrossRef Medline](#)
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495. [CrossRef Medline](#)
- Kesner RP, Rolls ET (2015) A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev* 48:92–147. [CrossRef Medline](#)
- Klausnitzer J, Manahan-Vaughan D (2008) Frequency facilitation at mossy fiber–CA3 synapses of freely behaving rats is regulated by adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 28:4836–4840. [CrossRef Medline](#)
- Kowalski J, Gan J, Jonas P, Pernía-Andrade AJ (2016) Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern in vivo in anesthetized rats. *Hippocampus* 26:668–682. [CrossRef Medline](#)
- Lanore F, Labrousse VF, Szabo Z, Normand E, Blanchet C, Mulle C (2012) Deficits in morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses in a mouse model of intellectual disability. *J Neurosci* 32:17882–17893. [CrossRef Medline](#)
- Lee AK, Epsztein J, Brecht M (2009) Head-anchored whole-cell recordings in freely moving rats. *Nat Protoc* 4:385–392. [CrossRef Medline](#)
- Lorteije JA, Rusu SI, Kushmerick C, Borst JG (2009) Reliability and precision of the mouse calyx of held synapse. *J Neurosci* 29:13770–13784. [CrossRef Medline](#)
- Marchal C, Mulle C (2004) Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol* 561:27–37. [CrossRef Medline](#)
- Margrie TW, Brecht M, Sakmann B (2002) In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Arch* 444:491–498. [CrossRef Medline](#)
- McBain CJ (2008) Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses. Amsterdam: Elsevier.
- Mori M, Abegg MH, Gähwiler BH, Gerber U (2004) A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431:453–456. [CrossRef Medline](#)
- Mori M, Gähwiler BH, Gerber U (2007) Recruitment of an inhibitory hippocampal network after bursting in a single granule cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7640–7645. [CrossRef Medline](#)
- Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863–876. [CrossRef Medline](#)
- Paladini CA, Tepper JM (1999) GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* 32:165–176. [CrossRef Medline](#)
- Pernía-Andrade AJ, Jonas P (2014) Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations. *Neuron* 81:140–152. [CrossRef Medline](#)
- Price CJ, Scott R, Rusakov DA, Capogna M (2008) GABAB Receptor modulation of feedforward inhibition through hippocampal neurogliaform cells. *J Neurosci* 28:6974–6982. [CrossRef Medline](#)
- Rollenhagen A, Sätzler K, Rodríguez EP, Jonas P, Frotscher M, Lübke JH (2007) Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 27:10434–10444. [CrossRef Medline](#)
- Rolls ET, Treves A (2011) The neuronal encoding of information in the brain. *Prog Neurobiol* 95:448–490. [CrossRef Medline](#)
- Sachidanandam S, Blanchet C, Jeantet Y, Cho YH, Mulle C (2009) Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29:5000–5008. [CrossRef Medline](#)
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13304–13309. [CrossRef Medline](#)
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184–187. [CrossRef Medline](#)
- Szabadics J, Soltesz I (2009) Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci* 29:4239–4251. [CrossRef Medline](#)
- Tamás G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902–1905. [CrossRef Medline](#)
- Torborg CL, Nakashiba T, Tonegawa S, McBain CJ (2010) Control of CA3 output by feedforward inhibition despite developmental changes in the excitation–inhibition balance. *J Neurosci* 30:15628–15637. [CrossRef Medline](#)
- Wilke SA, Antonios JK, Bushong EA, Badkoobehi A, Malek E, Hwang M, Terada M, Ellisman MH, Ghosh A (2013) Deconstructing complexity: serial block-face electron microscopic analysis of the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurosci* 33:507–522. [CrossRef Medline](#)

ARTICLE

Received 29 Feb 2016 | Accepted 12 May 2016 | Published 17 Jun 2016

DOI: 10.1038/ncomms11915

OPEN

Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A_{2A} receptors

Silvia Viana da Silva^{1,2}, Matthias Georg Haberl^{3,*}, Pei Zhang^{1,*}, Philipp Bethge¹, Cristina Lemos⁴, Nélío Gonçalves⁴, Adam Gorlewicz¹, Meryl Malezieux¹, Francisco Q. Gonçalves⁴, Noëlle Grosjean¹, Christophe Blanchet¹, Andreas Frick³, U Valentin Nägerl¹, Rodrigo A. Cunha^{4,5} & Christophe Mulle¹

Synaptic plasticity in the autoassociative network of recurrent connections among hippocampal CA3 pyramidal cells is thought to enable the storage of episodic memory. Impaired episodic memory is an early manifestation of cognitive deficits in Alzheimer's disease (AD). In the APP/PS1 mouse model of AD amyloidosis, we show that associative long-term synaptic potentiation (LTP) is abolished in CA3 pyramidal cells at an early stage. This is caused by activation of upregulated neuronal adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}R) rather than by dysregulation of NMDAR signalling or altered dendritic spine morphology. Neutralization of A_{2A}R by acute pharmacological inhibition, or downregulation driven by shRNA interference in a single postsynaptic neuron restore associative CA3 LTP. Accordingly, treatment with A_{2A}R antagonists reverts one-trial memory deficits. These results provide mechanistic support to encourage testing the therapeutic efficacy of A_{2A}R antagonists in early AD patients.

¹Interdisciplinary Institute for Neuroscience, University of Bordeaux, CNRS UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France. ²BEB PhD program CNC Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal. ³University of Bordeaux, Neurocentre Magendie, INSERM U862, F-33000 Bordeaux, France. ⁴CNC-Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal. ⁵Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M. (email: christophe.mulle@u-bordeaux.fr).

Loss of episodic hippocampal-dependent memory is the earliest clinical sign of Alzheimer's disease (AD), consistent with reduced activation of hippocampal regions during memory encoding tasks in patients with mild cognitive impairment¹. Synaptic loss is the best morphological correlate of cognitive impairment in early AD, rather than amyloid-beta plaques, tangle formation or neuronal loss². The CA3 subregion of the hippocampus encodes episodic memories, particularly at the earliest stage of acquisition, presumably by developing instant representations of a context³. The autoassociative network of recurrent connections among CA3 pyramidal cells (PCs) is thought to enable the storage of episodic memories through synaptic plasticity of these associative/commissural (A/C) inputs^{4,5}. In mouse models of AD, synaptic dysfunction has been mostly studied in the CA1 region or dentate gyrus with very few studies addressing deficits in CA3 (ref. 6). Long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses is generally impaired in mouse models of AD (refs 6,7). Whether synaptic plasticity is affected in the recurrent CA3 network in AD mouse models has not yet been addressed.

Dysregulation of NMDA receptors (NMDAR) has been proposed as a link between A β accumulation and disruption of LTP (ref. 8) although neuromodulation systems may also be impaired. Epidemiologic studies indicate that regular caffeine intake attenuates memory decline during aging⁹ and reduces the risk to develop AD (ref. 10). In animal models of AD, chronic caffeine intake prevents memory deterioration, an effect mimicked by the selective inhibition of A_{2A} receptors (A_{2A}R), which are a main target of caffeine¹¹. Conversely, the overactivation of hippocampal A_{2A}R is sufficient to disrupt memory performance¹². A_{2A}R are upregulated in cortical areas of AD patients¹³ including in the hippocampal formation¹⁴, but the mechanisms by which the blockade of A_{2A}R restores memory impairment are not understood. The impact of A_{2A}R may depend on the stage of progression of the disease, with a role for astrocytic A_{2A}R at late stages¹⁴. Here we provide evidence for early synaptic dysfunction in CA3 PCs in a mouse model of AD, and we explore the implication of NMDAR and A_{2A}R.

Results

Impaired A/C synaptic plasticity in CA3 in APP/PS1 mice. We performed whole-cell patch clamp recordings of CA3 PCs to characterize the synaptic properties of A/C inputs in 6-month-old male APP/PS1 (Amyloid precursor protein (APP) gene with Swedish mutation and presenilin 1 gene (PS1) with deletion of exon 9) mice at early stages of amyloid-beta deposition¹⁵ when the CA3 region appears largely spared (Supplementary Fig. 1a). We initially recorded excitatory postsynaptic current (mEPSCs), which arise from the different types of glutamatergic synapses impinging on CA3 PCs. The average amplitude of mEPSCs was significantly decreased in APP/PS1 compared with wild-type (wt) mice (wt: 29 ± 2 pA, APP/PS1: 23 ± 1 pA, $P = 0.007$), whereas mEPSC frequency, measured by the inter event interval (IEI), was only minimally affected (wt: 0.7 ± 0.2 s, APP/PS1: 0.9 ± 0.1 s; Supplementary Fig. 2a,b). The decreased amplitude was mainly attributed to mEPSCs with amplitudes < 50 pA, suggesting that large amplitude mEPSCs arising from mossy fibre-CA3 synapses¹⁶ were not affected (Supplementary Fig. 2b). We further found that the paired-pulse ratio (PPR) of A/C synaptic responses was not different between APP/PS1 (1.9 ± 0.1) and wt mice (1.8 ± 0.1), arguing against presynaptic alterations (Fig. 1a–c). Pairing of presynaptic activation and postsynaptic depolarization induces an NMDAR-dependent

LTP of A/C inputs in CA3 PCs (ref. 17). Pairing A/C stimulation (100 stimuli at 2 Hz) with a depolarization to 0 mV (Fig. 1a) induced a robust LTP of AMPA-EPSCs in wt mice ($218 \pm 38\%$), which was absent in APP/PS1 mice ($93 \pm 12\%$, $P < 0.0001$; Fig. 1d–f).

To explore the mechanisms underlying the abolition of LTP of A/C inputs in APP/PS1 mice, we first tested whether this loss was correlated with morphological alterations of CA3 dendritic spines. Bilateral stereotaxic injections of retrograde rabies virus expressing green fluorescent protein (GFP; RABV)¹⁸ into CA1 were performed to specifically label CA3 PCs. We quantified spine density and morphology in these neurons using stimulated emission depletion (STED) microscopy. We found a decrease in the density of spines in the *stratum radiatum* of APP/PS1 mice (wt: 11.5 ± 1.1 spines per $10 \mu\text{m}$, APP/PS1: 8.7 ± 0.6 spines per $10 \mu\text{m}$, $P = 0.037$; Fig. 2a,b). STED microscopy allowed us to examine traditionally neglected key nanoscale features of spine morphology (Supplementary Table 2). Although spine length was similar in both genotypes (wt: $0.82 \pm 0.02 \mu\text{m}$, APP/PS1: $0.81 \pm 0.02 \mu\text{m}$, Fig. 2c), we found a marked shift to larger spine heads in APP/PS1 mice (wt: $0.44 \pm 0.01 \mu\text{m}$, APP/PS1: $0.49 \pm 0.01 \mu\text{m}$, $P < 0.0001$, Fig. 3d), in parallel with shorter and wider spine necks (Fig. 2e,f and Supplementary Table 2). As synapse compartmentalization is strongly shaped by spine morphology¹⁹, these changes (Fig. 2g) could potentially explain the decreased ability of the pairing protocol to induce LTP. However, the compartmentalization factor, which is a measure of biochemical compartmentalization of spine synapses (see definition in the Methods section), was preserved because the effects of the structural changes cancelled each other out (Fig. 2h). Thus the morphological phenotype seems insufficient to explain the absence of LTP observed at A/C synapses in APP/PS1 mice.

Loss of A/C LTP is not associated with alterations of NMDAR.

We tested whether dysregulation of NMDAR function, which has been implicated in impaired synaptic plasticity in models of AD (ref. 8), may be causally related to the loss of LTP in APP/PS1 mice. Insufficient membrane potential depolarization can be ruled out as a possible cause for the loss of A/C LTP in APP/PS1 mice as our LTP protocol controls for postsynaptic membrane potential. We found no difference in synaptic NMDAR/AMPA ratio between wt ($36 \pm 4\%$) and APP/PS1 mice ($37 \pm 5\%$; Fig. 3a,b). However, the relative expression of different GluN2 NMDAR subunits at synapses may strongly modulate plasticity²⁰, and the toxic effects of amyloid-beta oligomers applied in cultured neurons and acute slices is thought to involve the GluN2B subunit^{21,22}. We found no difference in the inhibition of NMDAR EPSC amplitude by Ro25-6981 ($1 \mu\text{M}$), a selective antagonist of GluN2B-containing NMDAR (wt: $59.0 \pm 5.9\%$, APP/PS1: $73.6 \pm 7.6\%$; Fig. 3c,d) or in NMDAR EPSC decay time (Supplementary Fig. 3a,b), ruling out a major change in GluN2 subunit composition of synaptic NMDAR in CA3 PCs in APP/PS1 mice. The subcellular localization of NMDAR (synaptic versus extrasynaptic) leads to the activation of different intracellular signalling pathways; importantly, extrasynaptic NMDAR were shown to be essential for amyloid-beta mediated toxicity^{23,24}. We evaluated extrasynaptic NMDAR by measuring the amplitude of tonic NMDAR-mediated currents recorded at $+40$ mV. Tonic currents were blocked to the same extent by the NMDAR antagonist D-AP5 ($50 \mu\text{M}$) in both genotypes (wt: 34 ± 4 pA and APP/PS1: 30 ± 5 pA; Fig. 3e,f). In addition, the blockade of tonic currents by Ro25-6981 ($1 \mu\text{M}$) did not indicate any change in GluN2B content (Supplementary Fig. 3c,d). Finally, we reasoned that if dysregulation of NMDAR was responsible for

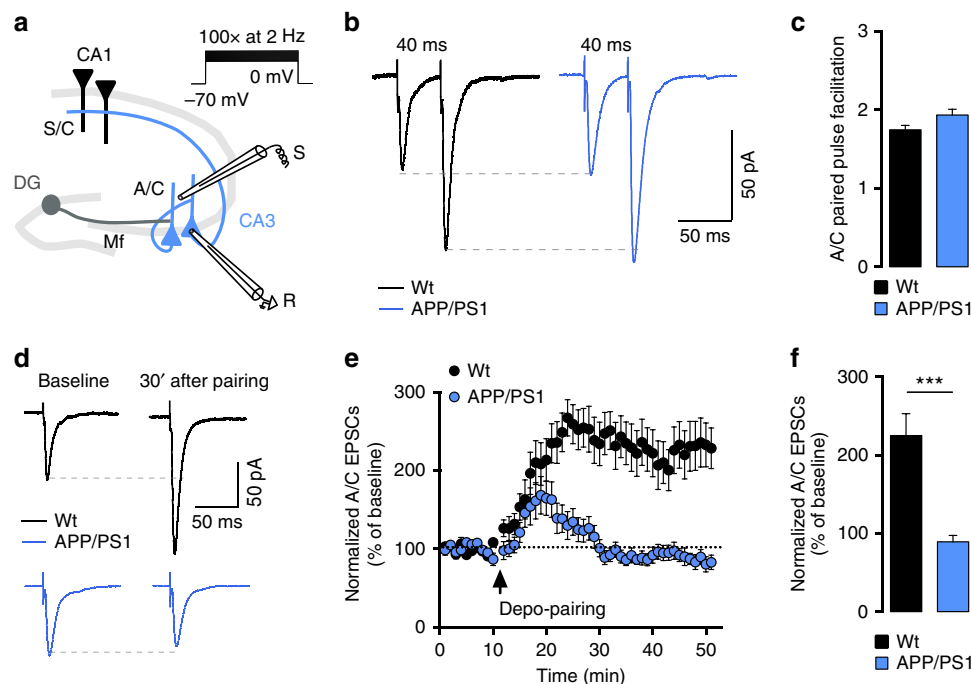


Figure 1 | Early synaptic alterations in 6-month-old APP/PS1 CA3 PCs. (a) Scheme illustrating the hippocampus with a recording electrode on a CA3 PC (R) and a stimulating electrode (S) in the stratum radiatum. Depo-pairing protocol used to trigger NMDAR-dependent LTP: depolarization of postsynaptic cell to 0 mV paired with 100 stimuli at 2 Hz frequency. (b) Example traces of paired-pulse responses (40 ms interval, average of 5 sweeps) in cells from both genotypes. (c) Bar graph summarizing PPR values in wt ($n=21$) and APP/PS1 mice ($n=25$; $P=0.054$, unpaired t -test). (d) Sample traces representing average A/C-EPSCs 10 min before and 30 min after depo-pairing protocol. (e) Summary time course of normalized A/C-EPSCs in the experiments illustrated in **d**. (f) The robust LTP of A/C synapses found in 6-month-old wt mice ($n=12$) is abolished in APP/PS1 mice ($n=11$, $***P<0.0001$, unpaired t -test; Supplementary Table 1). Recordings were performed in the presence of 10 μ M bicuculline and 3 μ M CGP55845.

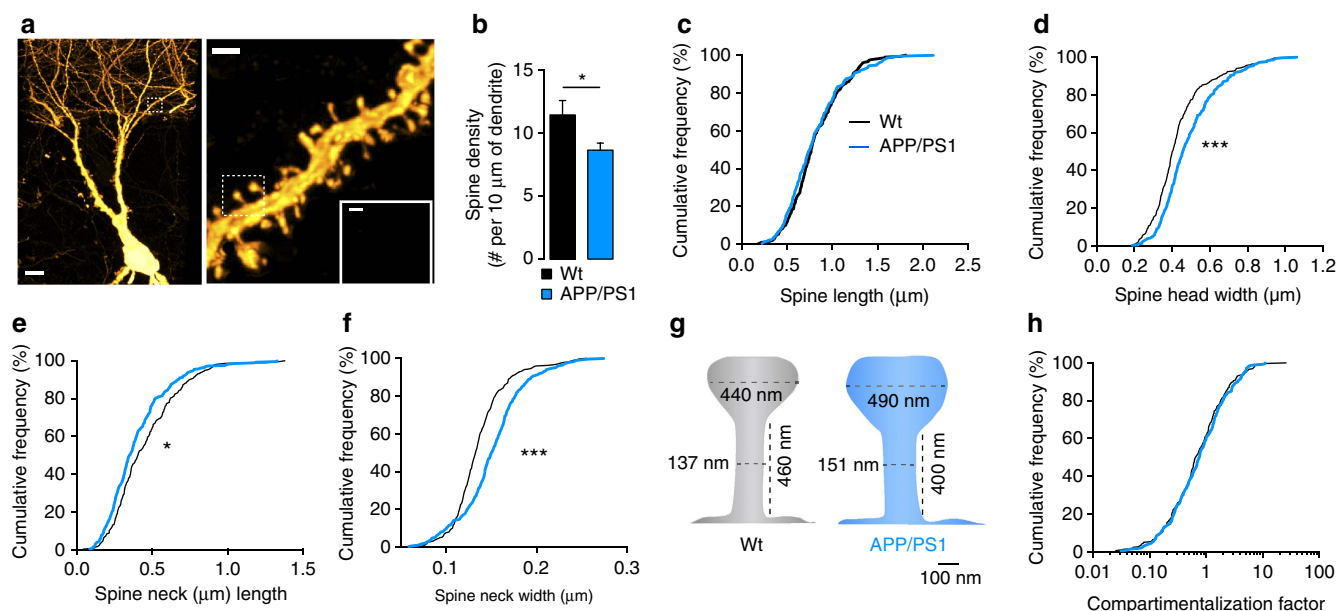


Figure 2 | Alterations in A/C spine morphology. (a) Representative STED images obtained from RABVAG-GFP(RG) infected neurons. Scale bar, left panel, 10 μ m; right panel, 1 μ m; inset, 250 nm. (b) Bar graph summarizing the reduction of spine density. Several branches of distal dendrites of CA3 PCs were analysed in wt ($n=8$ branches, 4 mice) and in APP/PS1 mice ($n=9$ branches, 4 mice; $*P=0.037$, unpaired t -test). (c) Cumulative distribution illustrating the absence of any difference in spine lengths between both genotypes (Kolmogorov-Smirnov (KS) test $P=0.144$). Number of spines analysed was equal for graphs from **c** to **h**, $n=300$ for wt and $n=288$ for APP/PS1, from four mice for each genotype. (d) Cumulative distribution of spine head width (KS-test $***P<0.0001$), (e) spine neck length (KS-test $*P=0.015$) and (f) spine neck width (KS-test $***P<0.0001$) from wt and APP/PS1 mice. (g) Schematic spines illustrating morphological alterations observed in A/C spines with mean values indicated. (h) The cumulative distribution of the compartmentalization factor calculated for each spine was not different between wt (1.35 ± 0.13) and APP/PS1 mice (1.35 ± 0.10 , $P=0.063$, KS-test).

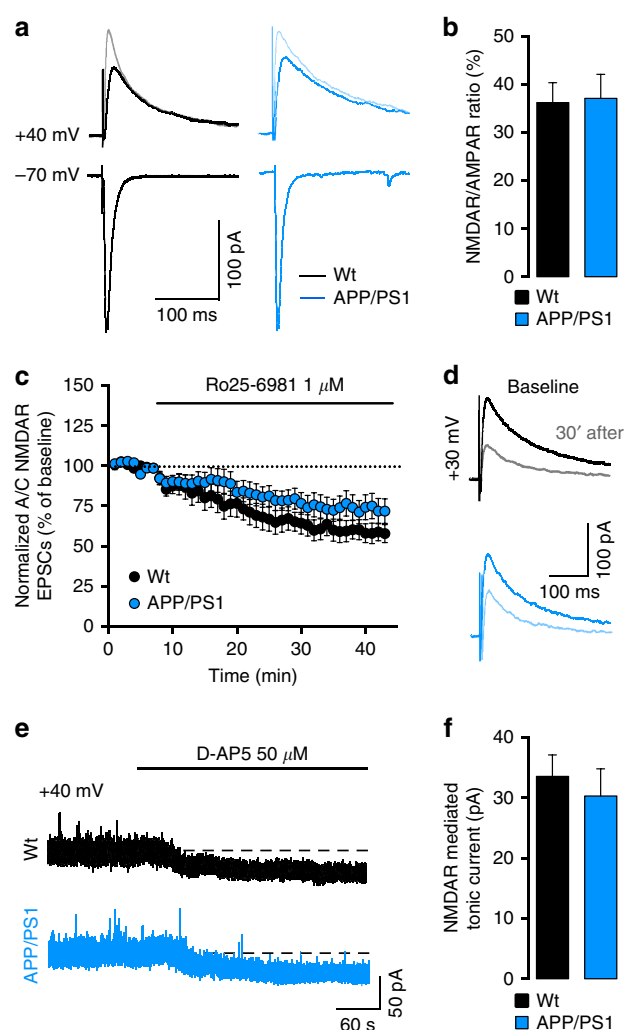


Figure 3 | Loss of A/C LTP is not associated with dysregulation of NMDAR. (a) A/C EPSCs were recorded at negative and positive potentials, and NMDAR-EPSCs were pharmacologically isolated with 20 μ M NBQX (darker traces at +40 mV). Traces represent the average of 40 sweeps recorded at 0.1 Hz. (b) Mean values of NMDAR/AMPA ratios obtained with isolated currents at -70 mV (AMPA) and +40 mV (NMDAR) from wt ($n=18$) and APP/PS1 mice ($n=16$; $P=0.894$, unpaired t -test). (c) Summary plot of the time course of A/C NMDAR-EPSCs amplitude during the application of Ro25-698 in wt ($n=13$) and APP/PS1 cells ($n=16$, $P=0.155$, unpaired t -test). Amplitude of A/C NMDAR-mediated EPSCs was normalized to the mean amplitude of an 8 min baseline period and quantification was performed after 30 min of drug application. (d) Average traces of pharmacologically isolated (20 μ M NBQX) A/C NMDAR-EPSCs obtained at a stimulation frequency of 0.1 Hz during baseline and after 30 min of Ro25-698 (1 μ M) application (lighter traces). (e) Representative examples of the shift in holding current observed in CA3 PCs clamped at +40 mV in response to D-AP5 revealing the tonic activation of extrasynaptic NMDAR at rest. AMPAR and KAR were blocked with 20 μ M NBQX. (f) Summarizing bar graph representing the shift of inward current in wt ($n=14$) and APP/PS1 cells ($n=14$, $P=0.573$, unpaired t -test). Data calculated as the difference between the last min of baseline and the last min after a 6-min D-AP5 application. Recordings were performed in the presence of 10 μ M bicuculline and 3 μ M CGP55845.

the loss of A/C LTP in APP/PS1 mice, then the selective potentiation of synaptic NMDAR by D-serine²⁵ may rescue plasticity. Enhancement of synaptic NMDAR by bath application of 10 μ M D-serine (~20% increase in current amplitude,

Supplementary Fig. 3e–g) did not rescue A/C LTP in APP/PS1 mice ($109.0 \pm 9.5\%$, Supplementary Fig. 3h–j and Supplementary Table 1) or alter A/C LTP in wt mice. Hence, the complete loss of A/C LTP in 6-month-old APP/PS1 mice does not appear to correlate with alterations in the function or GluN2B content of neither synaptic nor extrasynaptic NMDAR.

Inhibition of A_{2A}R rescues A/C LTP in APP/PS1 mice. A_{2A}R control synaptic plasticity¹², are involved in memory impairment^{11,26} and are upregulated in the brain of AD patients^{13,14} and animal models of AD^{27,28}. We used a binding assay on isolated CA3 synaptic membranes and showed a robust increase of A_{2A}R density in 6-month-old APP/PS1 mice (wt: 38 ± 7 fmol per mg protein; APP/PS1: 75 ± 6 fmol per mg protein, $P=0.002$; Fig. 4a). Based on these results, we investigated if a short incubation of the slices for 10 min with the selective A_{2A}R antagonist SCH58261 (50 nM) could affect synaptic plasticity at A/C synapses. Strikingly, SCH58261 rescued in large part A/C LTP in APP/PS1 synapses ($160 \pm 16\%$), in comparison with APP/PS1 slices treated with vehicle solution ($98 \pm 9\%$, Fig. 4b–d). ZM241385 (50 nM), a chemically distinct and selective A_{2A}R antagonist was equally effective in rescuing A/C LTP (wt: $165.9 \pm 20.8\%$, $P=0.063$; Fig. 4d and Supplementary Table 1). The difference in mEPSCs amplitude observed between APP/PS1 and wt littermates (wt: 25.2 ± 1.5 pA; APP/PS1: 19.5 ± 1.1 pA) was not rescued by a short incubation with SCH58261 (wt_{SCH}: 24.0 ± 1.5 pA; APP/PS1_{SCH}: 19.6 ± 0.8 pA; $P=0.006$ for genotype effect; $P=0.173$ for drug effect, Supplementary Fig. 4a–c). Similarly, the distribution of mEPSCs amplitudes in both genotypes was not altered by SCH58261 (Supplementary Fig. 4b). Although SCH58261 incubation caused a small alteration in the distribution of IELs between mEPSCs (Supplementary Fig. 4d), it did not cause any significant effect on the mean IEL values (wt_{Baseline}: 0.4 ± 0.1 s; wt_{SCH58261}: 0.6 ± 0.2 s; APP/PS1_{Baseline}: 0.6 ± 0.2 s; APP/PS1_{SCH58261}: 0.8 ± 0.2 s, Supplementary Fig. 4e).

A_{2A}R act synergistically with mGluR5 in hippocampal neurons²⁹, and mGluR5 antagonists rescue contextual fear conditioning in APP/PS1 mice³⁰. Accordingly, we found that a selective antagonist of mGluR5 (MTEP, 10 μ M) also rescued A/C LTP levels in APP/PS1 mice to values similar to those obtained with the A_{2A}R antagonist SCH58261 ($164 \pm 28\%$, Fig. 5a–c). A combined incubation with both MTEP and SCH58261 did not further increase A/C LTP levels in 6-month-old APP/PS1 mice ($163 \pm 18\%$, $P=0.008$, Fig. 5a–c and Supplementary Table 1), suggesting that A_{2A}R and mGluR5 operate through a common pathway to impair LTP. Importantly, these antagonists did not further increase the level of A/C LTP in wt mice (Supplementary Fig. 5a–c and Supplementary Table 1). Pharmacological inhibition of either A_{2A}R or mGluR5 did not fully rescue A/C LTP, possibly because the antagonists attenuate LTP in wt mice (Supplementary Fig. 4e,f). Adenosine neuromodulation depends on a balanced activation of inhibitory A₁R and A_{2A}R. We tested whether adenosine A₁R levels were comparatively affected by using a binding assay on purified CA3 synaptic membranes and observed a modest increase of A₁R density in 6-month-old APP/PS1 mice (wt: 938.2 ± 27.2 fmol per mg protein; APP/PS1: 1044.0 ± 19.0 fmol per mg protein, $P=0.002$; Supplementary Fig. 6a). To test if this alteration in A₁R density affected A/C synapses, we recorded evoked AMPAR EPSCs and bath applied 100 nM DCPCX (a selective A₁R antagonist). DCPCX equally increased the amplitude of AMPAR EPSCs in APP/PS1 ($134.0 \pm 11.0\%$) and wt mice ($143.3 \pm 17.8\%$, Supplementary Fig. 6b–d), arguing for similar levels of A₁R at those synapses.

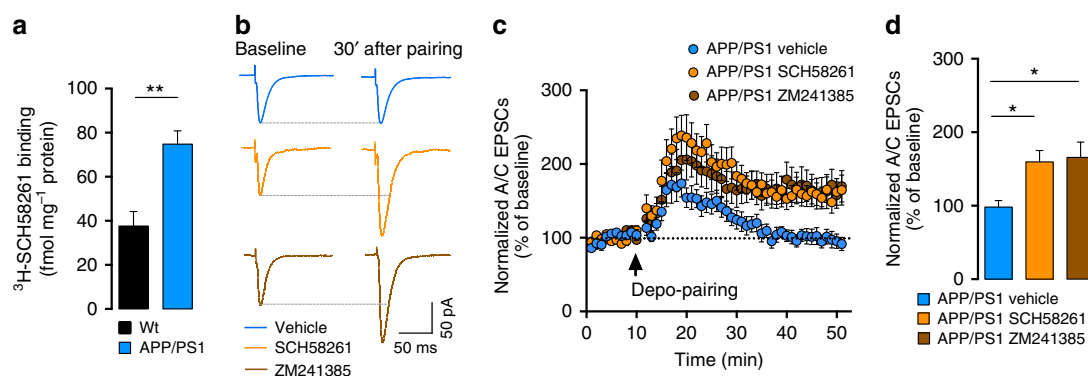


Figure 4 | Blockade of neuronal A_{2A}R restores synaptic plasticity in CA3 PCs. (a) The density of A_{2A}R is increased in synaptic membranes prepared from the CA3 region of APP/PS1 mice compared with wt littermates ($n = 6$, $**P = 0.002$, Mann-Whitney test). (b) Example traces representing a 10 min average of A/C-EPSCs before and 30 min after depolarizing LTP protocol in the presence of SCH58261 (50 nM) or ZM241385 (50 nM). (c) Summary time course of normalized A/C-EPSCs recorded from APP/PS1 mice during LTP protocol performed in the presence of the two different A_{2A}R antagonists or in control conditions. (d) Bar graph representing mean LTP amplitude recorded at 30–40 min after depolarizing protocol represented in c. A 10-min incubation period with two different classes of A_{2A}R antagonists, SCH58261 ($n = 11$) and ZM241385 ($n = 12$, $P = 0.006$ Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test), rescued the LTP of A/C synapses in APP/PS1 mice ($n = 11$ for vehicle, Supplementary Table 1). Electrophysiology recordings were performed in the presence of 10 μM bicuculline and 3 μM CGP55845.

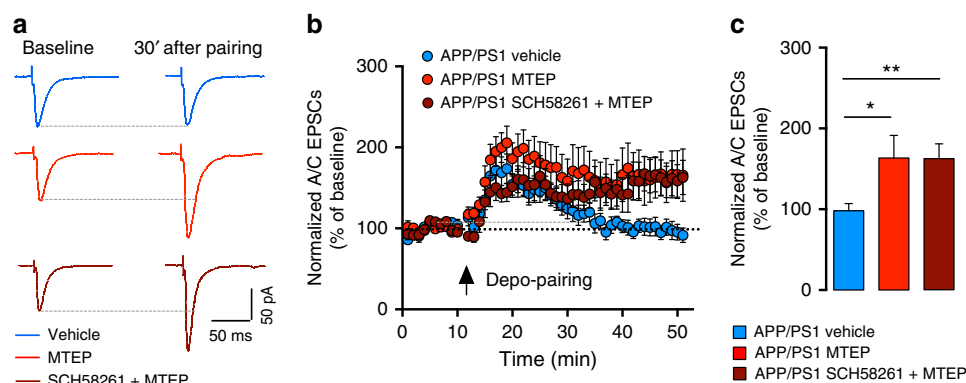


Figure 5 | A_{2A}R and mGluR5 are involved in the loss of A/C LTP in APP/PS1 mice. (a) Example traces representing the average of A/C-EPSCs 10 min before and 30 min after depolarizing LTP protocol. Recordings were performed in the presence of 10 μM bicuculline and 3 μM CGP55845. (b) Summary time course of normalized A/C-EPSCs recorded from APP/PS1 mice during LTP protocol performed in the presence of MTEP (10 μM) and MTEP + SCH58261 (50 nM). (c) Bar graph representing mean LTP amplitude recorded at 30–40 min after depolarizing protocol represented in b. A 10-min incubation with MTEP ($n = 12$) or MTEP + SCH58261 ($n = 11$, $P = 0.008$ Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test) rescued the LTP of A/C synapses in APP/PS1 mice ($n = 11$ for vehicle group, Supplementary Table 1).

A_{2A}R antagonists can prevent A β -induced memory impairment in mice²⁶. We thus tested whether SCH58261 (intraperitoneal injection, 0.1 mg per kg, for 6–7 days) could revert deficits in one-trial memory tasks, which depend on CA3 circuits^{3,4}, in a different group of 6-month-old APP/PS1 mice. When tested in the object displacement paradigm (30 min inter-trial interval), APP/PS1 mice showed impaired recognition of a displaced object, which was rescued on A_{2A}R inhibition (Fig. 6a–c). Wt mice treated with saline displayed a higher displacement index ($68.2 \pm 4.0\%$), whereas APP/PS1 mice did not show any preference for the displaced object ($54.9 \pm 4.1\%$, $P = 0.034$ for genotype effect, Fig. 6b). This difference between genotypes was abrogated by SCH58261 treatment (wt_{SCH58261}: $63.5 \pm 3.3\%$; APP/PS1_{SCH58261}: $60.0 \pm 3.7\%$). Likewise, A_{2A}R inhibition rescued the performance of APP/PS1 mice in a modified Y-maze task (30 min inter-trial interval), as shown by the increase in the percentage of time exploring the novel arm (wt_{Saline}: 40.5 ± 2.4 and APP/PS1_{Saline}: $34.6 \pm 2.8\%$, $P = 0.024$ for genotype effect, Fig. 6d–f). APP/PS1 mice treated with SCH58261 showed no difference in the time spent in the novel arm ($42.7 \pm 4.1\%$) when compared with wt mice treated with SCH58261 ($46.9 \pm 2.7\%$, Fig. 6e).

A_{2A}R expressed in CA3 PCs are involved in A/C LTP deficits. Since both neuronal¹² and astrocytic A_{2A}R (ref. 14) may control memory performance, we sought to understand if the pharmacological rescue of plasticity at early stages of AD is either due to an action on neurons or glia. For this purpose, we employed a knockdown approach of A_{2A}R in neurons using a VSV-G-coated lentivirus expressing shRNA against A_{2A}R and a fluorescent marker (shA_{2A}R, see validation in Supplementary Information). One month after stereotaxic infection in the CA3 region of 5-month-old APP/PS1 mice, a few GFP-positive CA3 PCs (shA_{2A}R⁺, expressing the shRNA) could be identified in hippocampal slices (Fig. 7a). To check for neuronal tropism of the lentiviral construct, we injected eGFP-shA_{2A}R lentivirus in the CA3 region of wt mice and performed immunohistochemistry on hippocampal sections. We observed a near exclusive co-localization with the neuronal marker NeuN for virally injected eGFP-positive cells, whereas no co-localization was observed with the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Supplementary Fig. 7).

We found that genetic silencing of A_{2A}R in individual CA3 PCs rescued LTP of A/C synapses in these cells in 6-month-old APP/

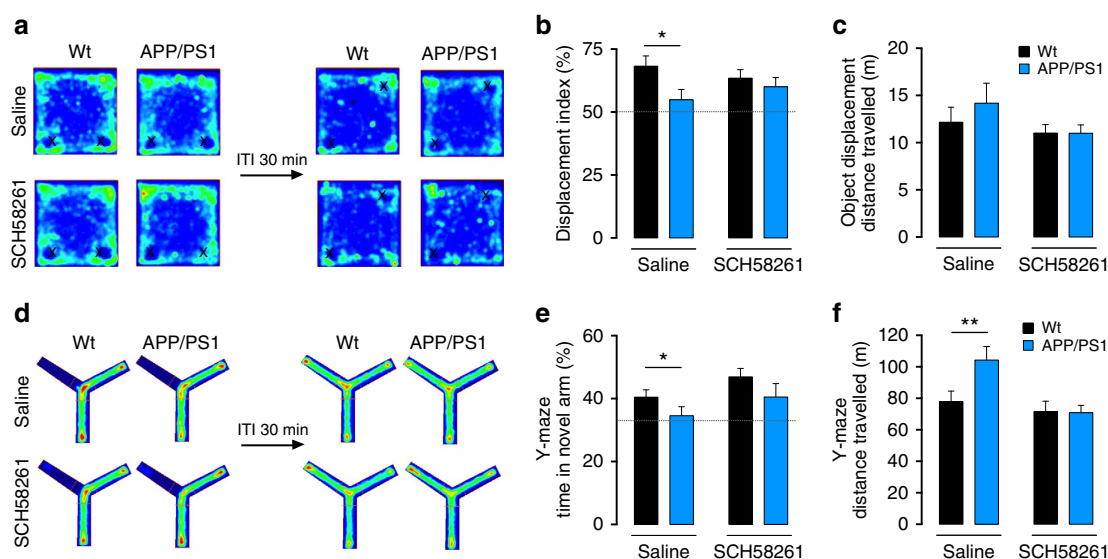


Figure 6 | Treatment with $A_{2A}R$ blockers restores one-trial memory impairment in APP/PS1 mice. (a) Average occupation plot representing the pattern of exploration of the mice in the object displacement test. Mice were treated with SCH58261 or saline for 6 days (b) Bar graph representing the percentage of time spent by mice exploring the displaced object. The displacement index is higher in wt_{saline} ($n=12$) when compared with $APP/PS1_{saline}$ ($n=9$, $*P=0.034$, two-way ANOVA, genotype effect; Sidak's multiple comparisons test wt_{saline} versus $APP/PS1_{saline}$, $*P=0.0374$). By contrast, whereas SCH58261 is devoid of effects in wt ($n=11$, Sidak's multiple comparisons test wt_{saline} versus $wt_{SCH58261}$, $P=0.594$), it reverted the lower percentage of time that APP/PS1 mice interacted with the novel object ($n=10$, Sidak's multiple comparisons test $APP/PS1_{saline}$ versus $APP/PS1_{SCH58261}$, $P=0.6047$). (c) No alterations were found in the average distance travelled by mice (wt_{saline} : 12.2 ± 1.6 m, $n=12$, $APP/PS1_{saline}$: 14.5 ± 1.9 m, $n=9$, $P=0.405$; $wt_{SCH58261}$: 11.0 ± 0.9 m, $n=11$, $APP/PS1_{SCH58261}$: 11.0 ± 0.9 m, $n=10$, $P=0.096$, two-way ANOVA). (d) Average occupation plot of exploration in the Y-maze task. (e) Bar graph representing the percentage of time spent in the novel arm by wt and APP/PS1 mice treated with SCH58261 or saline for 7 days. When comparing APP/PS1 ($n=9$) and wt ($n=12$) mice in the saline groups, we observed a difference in the percentage of time spent in the novel arm ($*P=0.024$, two-way ANOVA, genotype effect; Sidak's multiple comparisons test wt_{saline} versus $wt_{SCH58261}$, $*P=0.0347$). SCH58261 treatment had no effect in wt groups ($n=11$, Sidak's multiple comparisons test wt_{saline} versus $wt_{SCH58261}$, $P=0.901$), but reverted the memory deficit in APP/PS1 mice ($n=10$, Sidak's multiple comparisons test $APP/PS1_{saline}$ versus $APP/PS1_{SCH58261}$, $P=0.410$) (f) Distance travelled in the test phase of the modified Y-maze (wt_{saline} : 77.9 ± 6.7 m, $n=12$, $APP/PS1_{saline}$: 104.2 ± 8.6 m, $n=9$; $wt_{SCH58261}$: 71.5 ± 6.7 m, $n=11$, $APP/PS1_{SCH58261}$: 70.8 ± 4.8 m, $n=10$, $**P=0.006$, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test). Horizontal dashed lines in b and e represent the random displacement values for better visualization.

PS1 mice. LTP of A/C synapses did not recover in uninfected neighbouring $sh-A_{2A}R^{-}$ CA3 PCs ($shA_{2A}R^{+}$: $174 \pm 20\%$, $shA_{2A}R^{-}$ cells: $92 \pm 9\%$, $P=0.001$; Fig. 7a–c) or in cells infected with scramble RNA ($scrRNA^{+}$: $105 \pm 8\%$, Fig. 7d–f). A/C LTP could be rescued in $scrRNA^{+}$ cells with a short SCH58261 incubation as in control APP/PS1 CA3 PCs ($168 \pm 6\%$, $P=0.0014$, Fig. 7d–f). Furthermore, the extent of A/C LTP following SCH58261 incubation was not different between $scrRNA^{+}$ and $shRNA^{+}$ cells ($173 \pm 15\%$), indicating that the $A_{2A}R$ shRNA occludes the effect of SCH58261 in $shRNA^{+}$ cells and not in control neurons (Supplementary Table 1 and Fig. 7f). This strongly suggests that the loss of A/C LTP is caused by gain of function of $A_{2A}R$ specifically in neurons and not glial cells at this early stage of AD. In addition, removal of $A_{2A}R$ from a single postsynaptic CA3 PC is sufficient to rescue A/C LTP, strongly suggesting a pathological function of postsynaptic $A_{2A}R$.

Discussion

This study provides the first characterization of AD-related synaptic impairment in the autoassociative network of recurrent connections between CA3 PCs which is crucially involved in the initial encoding of memory^{3,5}. At early stages of AD pathology in APP/PS1 mice, we found no major alteration of basal AMPAR or NMDAR-mediated transmission. However, we show that associative pairing between presynaptic A/C stimulation and postsynaptic spiking failed to induce LTP in single CA3 PCs.

Studies of LTP in mouse models of AD have often provided contradictory results⁶, possibly depending on the age and on the

experimental conditions to induce plasticity. In CA1, LTP of field EPSPs induced by high-frequency stimulation is attenuated—but not abolished—in an age-dependent manner in 4–6-month-old APP/PS1 mice³¹. Spine shape may determine the ability of synapses to undergo LTP by tuning biochemical and electrophysiological compartmentalization¹⁹. We observed a moderate decrease of spine density, which may correlate with subtle differences in the frequency of mEPSCs but cannot explain the abolition of LTP. Using STED microscopy, we unravelled subtle changes in spine necks and spine heads in 6-month-old APP/PS1 mice. However, as the morphological changes are predicted to leave biochemical synapse compartmentalization intact, it is unlikely that differences in synapse morphology can account for the LTP defect in APP/PS1 mice.

Associative LTP of A/C synapses depends on the activation of NMDAR during the induction phase^{17,32}. Many studies have proposed NMDAR and in particular GluN2B-containing NMDAR as targets for A β peptides⁸. GluN2B is thought to be important for induction of LTP, due to the direct physical interaction of its C-terminal tail with CaMKII (ref. 33). Our electrophysiological results indicate that the loss of A/C LTP in APP/PS1 mice cannot be attributed to decreased function of synaptic NMDAR or to a major change of GluN2B-containing NMDAR. We found no change in tonically activated extrasynaptic NMDAR, which were proposed to participate in the inhibition of LTP by soluble A β oligomers²³. In line with our data, chronic blockade of GluN2B-containing NMDAR does not rescue behaviour or spine morphology in PS2APP mice³⁴. We do not exclude the possibility that NMDAR

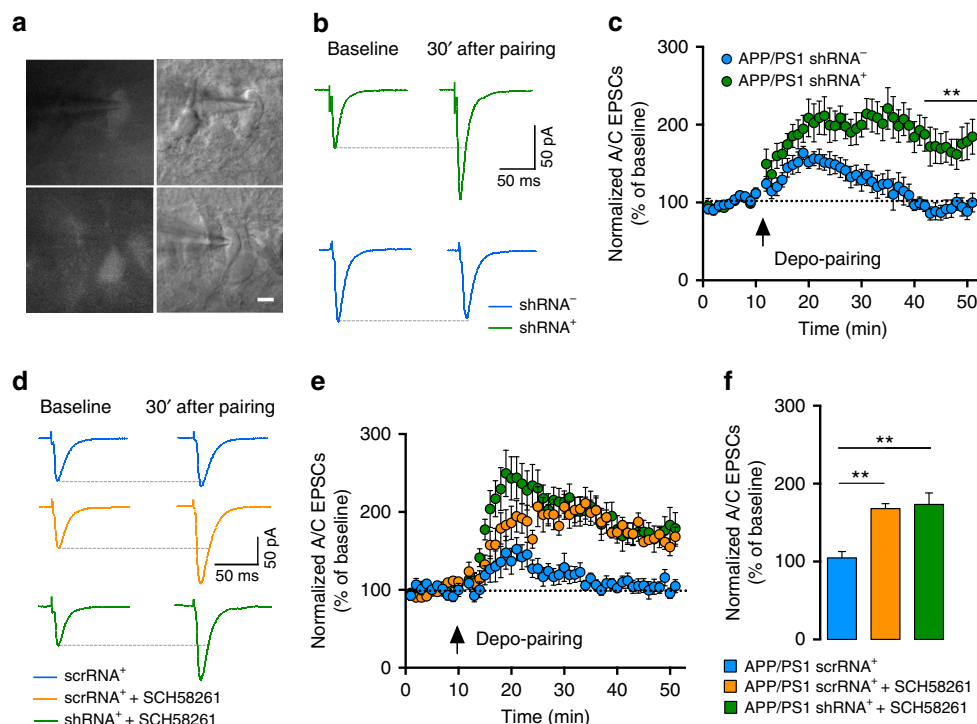


Figure 7 | Genetic silencing of neuronal $A_{2A}R$ restores A/C LTP. (a) Example pictures of CA3 PCs infected with shRNA lentivirus. Infected cells ($shRNA^+$) and non-infected cells ($shRNA^-$) in the proximity of infected cells were patched for the experiments in b. Scale bar represents 10 μm . (b) Example traces representing average A/C-EPSCs 10 min before and 30 min after LTP protocol in infected and non-infected cells. (c) Summary time course of normalized A/C-EPSCs during depo-pairing LTP protocol, recorded from APP/PS1 mice injected with $A_{2A}R$ shRNA; in $shRNA^+$ cells there was a rescue of the A/C LTP ($n=7$) that was absent in $shRNA^-$ cells ($n=7$, $^{**}P=0.001$, Mann-Whitney test, Supplementary Table 1). (d) Example traces representing the average of A/C-EPSCs 10 min before and 30 min after depo-pairing LTP protocol in infected cells with $A_{2A}R$ shRNA or scrRNA lentivirus. (e) Summary time course of normalized A/C-EPSCs recorded from APP/PS1 mice during LTP protocol performed in scrRNA⁺ cells ($n=9$) in the absence and scrRNA⁺ ($n=7$) or $shRNA^+$ cells ($n=9$) in the presence of SCH58261 (50 nM). (f) Bar graph representing mean LTP amplitude recorded at 30–40 min after depo-pairing protocol represented in e. APP/PS1 cells infected with scrRNA virus (scrRNA⁺) do not sustain LTP (Supplementary Table 1). A 10-min incubation period with SCH58261 increased LTP amplitude of scrRNA⁺ cells to levels similar to the genetic silencing of $A_{2A}R$ (Supplementary Table 1). In $shRNA^+$ cells, SCH58261 did not further increase the LTP levels ($^{**}P=0.0014$, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test between groups). All electrophysiology recordings were performed in the presence of 10 μM bicuculline and 3 μM CGP55845.

signalling may be strongly compromised at later stages of AD. However our study suggests that NMDAR may not be a valid target to restore hippocampal synaptic plasticity and the moderate cognitive deficits at early stage of AD pathology, in support of the lack of clinical efficiency of memantine in mild AD (ref. 35).

Strikingly, we found that the acute inhibition of $A_{2A}R$ by two different antagonists rescued LTP of A/C synapses, strongly suggesting that activation of $A_{2A}R$ by ambient adenosine or by adenosine produced during the LTP induction protocol disrupts synaptic plasticity in APP/PS1 mice. This raises several questions with regards to the source of adenosine, the cellular localization of $A_{2A}R$ and the signalling mechanism engaged to compromise LTP. On brain injury, $A_{2A}R$ undergo increased expression in both neurons and glia^{14,36}; their conditional removal from astrocytes ameliorates spatial memory selectively at later stages of AD (ref. 14). Our pharmacological experiments do not allow distinguishing effects of the antagonists on glial cells, pyramidal neurons or interneurons. However, we found that $A_{2A}R$ are upregulated in CA3 synapses at early stages of AD. Moreover, silencing $A_{2A}R$ selectively in an individual CA3 PC is sufficient to restore A/C LTP. Thus, the increase of $A_{2A}R$ in postsynaptic CA3 PCs can by itself explain the abolition of LTP. Although we cannot rule out an increased expression of astrocytic $A_{2A}R$ at this stage, this is not required for impaired plasticity. Interestingly, the

prevention of synaptic plasticity can be relieved by acute antagonism of $A_{2A}R$, providing some potential therapeutic strategies for early cognitive dysfunction in AD. Accordingly, the treatment of APP/PS1 mice with SCH58261 improved their one-trial spatial memory performance in both an object displacement and a modified Y-maze task, which is thought to depend on the activity of CA3 circuits³. More work is necessary to establish clear links between impaired A/C LTP and rapid acquisition of memory. Systemic administration of SCH58261 did not affect recall in one-trial memory tasks in wt mice, although it partly inhibited A/C LTP. Conversely, in APP/PS1 mice, behavioural deficits were markedly improved by SCH58261 administration, although A/C LTP deficit was only partly reverted.

The mechanism by which activation of upregulated $A_{2A}R$ compromises LTP is unknown. Because silencing $A_{2A}R$ in an individual CA3 PC rescues LTP, postsynaptic $A_{2A}R$ are likely at play. $A_{2A}R$ are pleiotropic receptors activating multiple G proteins and transducing pathways; the extended C-terminal domain of $A_{2A}R$ engages several proteins other than those canonically involved in signalling by G-protein coupled receptors³⁷. Furthermore, the signalling pathways of upregulated $A_{2A}R$ in disease-like conditions may be altered³⁸. Which of these multiple transducing systems is associated with the control by $A_{2A}R$ of synaptic plasticity is still unknown.

The ability of both A_{2A}R and mGluR5 to disrupt A/C LTP is intriguing and may provide a clue to the underlying mechanism²⁹. Interestingly, A_{2A}R and mGluR5 are both also necessary for the expression of LTP of NMDARs in CA3 PCs (ref. 39). The molecular mechanisms by which the amount of A_{2A}R is increased at early stages in neurons and at later (neuroinflammatory) stages in astrocytes still remains to be deciphered, in view of the complexity of the A_{2A}R gene promoter⁴⁰. Upregulation of A_{2A}R at early stages may not be restricted to CA3 PCs and may include interneurons and interneuronal connections to regulate the overall excitability of CA3 circuits⁴¹. Nevertheless, postsynaptic A_{2A}R in CA3 PCs, rather than such possible alterations account for deficits in A/C CA3 LTP.

Overall, the present study shows that at the early onset of AD-like features in APP/PS1 mice, associative long-term synaptic plasticity is abolished in CA3 PCs due to the activation of upregulated A_{2A}R in the postsynaptic compartment rather than to modifications of synaptic structure or NMDAR function. Our results are based on one-mouse model of AD, and it would certainly be important in the near future to extend this to other experimental models of cognitive deficits. Nonetheless, the exquisite ability of A_{2A}R blockade to restore the defective A/C CA3 LTP in APP/PS1 mice, in parallel to studies linking A_{2A}R to cognitive deficits^{11,12}, provides an additional mechanistic support to encourage testing the therapeutic efficacy of A_{2A}R antagonists in early AD patients.

Methods

Mice. APP/PS1 mice were obtained from Jackson's Lab and used according to regulations of the University of Bordeaux/CNRS Animal Care and Use Committee. The colony was maintained in a hemizygote state by crossing transgenic female mice to B6C3F1/J male mice. Throughout all their life, littermate wt and APP/PS1 male mice were housed in groups ranging from 4 to 10 animals per cage with free access to water and food. The large transparent plexiglas cages were kept in a temperature-regulated room on a 12-h light/dark cycle, and protected from exterior pathogens by a filter. All experiments were performed in the light phase of the circadian cycle in 6 months APP/PS1 and age-matched wt littermates.

Electrophysiology. Mice were anaesthetized with a ketamine (75 mg kg⁻¹) and xylazine (10 mg kg⁻¹) mix and intracardially perfused with ice-cold oxygenated cutting solution composed of 200 mM of sucrose, 20 mM glucose, 0.4 mM CaCl₂, 8 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 1.3 mM ascorbate, 0.4 mM pyruvate and 3 mM kynurenic acid (pH 7.3). When the solution coming out of the heart was free of blood, mice were decapitated and the head immersed in ice-cold cutting buffer. The brain was quickly dissected and parasagittal slices (350 µm thick) were cut using a Leica vibratome (Leica VT 1200S) in the same solution. The slices were kept for 20 min in an oxygenated resting artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 110 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.8 mM CaCl₂, 8 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 0.4 mM ascorbate, 3 mM pyruvate and 14 mM glucose (pH 7.3) at 33 °C in the presence of kynurenic acid (2 mM). The slices were then transferred into another resting aCSF, now without kynurenic acid and left at room temperature for a maximum of 6 h after cutting. All drugs from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated (see Supplementary Table 3 for details).

Cells were identified by differential interference contrast microscopy using an Olympus fixed stage upright microscope (BX51WI) equipped with a ×40 magnification immersion objective. Once at the electrophysiology set-up, slices were superfused with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) aCSF composed by 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ and 14 mM glucose (pH 7.4) and with 10 µM bicuculline. A period of 10 min was allowed for slice stabilization and removal of the excess Mg²⁺ from the resting solution. Whole-cell recordings were made at room temperature from visually identified CA3 PCs with borosilicate glass capillaries with 3–5 MΩ resistance filled with 140 mM CsMSO₃, 2 mM MgCl₂, 4 mM NaCl, 0.2 mM EGTA, 5 mM phosphocreatine, 3 mM ATPNa₂, 0.4 mM GTP and 10 mM HEPES (pH 7.2). The access resistance was <20 MΩ and the experiment was discarded if it changed by >20%. EPSCs were evoked using a patch pipette (~5 MΩ) filled with aCSF positioned in the CA3 stratum radiatum. The identification of the A/C synaptic currents was performed according to the following criteria: (1) frequency facilitation not >1.2 when switching stimulation from 0.1 to 1 Hz, (2) paired-pulse facilitation ratio <3 and (3) EPSCs decays free of a secondary peak that might indicate the presence of polysynaptic contamination. No liquid-junction potential correction was used. Recordings were made using an EPC10.0 amplifier (HEKA

Elektronik), filtered at 0.5–1 kHz and analysed using IGOR Pro and Neuromatic V2.6 softwares.

Stereotaxic injections and viral vectors. A small hairpin (sh) RNA was engineered to target the mouse A_{2A}R (shA_{2A}RNA), with the following sequence: 5'-CTA GTT TCC AAA AAG AAC AAC TGC AGT CAG AAA TCT CTT GAA TTT CTG ACT GCA GTT GTT-3' and 5'-CGG GGA TCT GTG GTC TCA TAC AGA AC-3'. These oligomers and the H1 forward primer 5'-CAC CGA ACG CTG ACG TCA TCA ACC CG-3' were used for PCR with the pBC-H1 plasmid (pBC; Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) containing the H1 promoter (GenBank: X16612, nucleotides 146–366) as a template. The silencing H1-shRNA cassettes were inserted into the lentivector plasmid SIN-cPPT-PGK-EGFP-WHV-LTR-TRE-RFA together with an EGFP reporter gene. As a control, we engineered a lentivector expressing a scrambled sequence of the RNA targeting A_{2A}R (scrRNA). Both the shA_{2A}RNA and scrRNA were packaged in VSV-G-coated lentiviral vectors. Lentivectors were produced in HEK293T cells, with a four-plasmid system, as previously described⁴² and the lentiviral particles content was determined by assessing HIV-1 p24 antigen levels (Gentaur, Spain). Viral stocks were stored at –80 °C until use and were thawed on ice before their *in vivo* administration. For control experiments, the lentivectors were administered to mice anaesthetized with avertin (240 µg g⁻¹, i.p.) and placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, USA). To test the *in vivo* efficiency of the shA_{2A}RNA, we first injected the lentivector (286,000 ng of p24 antigen per ml) unilaterally into the mouse striatum, where the high density of A_{2A}R allows a faithful quantification of A_{2A}R downregulation. Mice received 1.4 µl of shA_{2A}RNA or scrRNA (0.2 µl per min) with an automatic injector (Stoelting) in the following coordinates: antero-posterior: +0.6 mm; medio-lateral: ±1.8 mm; and ventral: –3.3 mm. After 3 weeks, an immunohistochemical analysis of the percentage striatal area labelled with eGFP (ref. 43) showed that the lentivectors transfected 27.2 ± 2.7% (n = 4) of the volume of dorsal striatum. This caused a 68 ± 8% (n = 4) decrease of A_{2A}R mRNA expression, evaluated by quantitative PCR (ref. 44) and a 55 ± 6% (n = 4) decrease of A_{2A}R protein density in the striatum, as evaluated by Western blot analysis⁴⁵. Mice were kept in their home cages for 4 weeks before being killed for preparation of slices and recording of transfected and non-transfected neurons, identified by the presence or absence of eGFP. The estimated amount of cells transfected varied from experiments to experiments and was ~15 cells per slice and 600 cells per infection (similar profile to Supplementary Fig. 6).

The GFP expressing RABV were stereotaxically injected as previously described⁴⁶ in CA1 stratum radiatum and the cellular CA3 morphology was analysed after 6 days. For STED microscopy, we performed immunohistochemistry (anti-GFP Alexa 488) on 60 µm brain sections to further increase the signal to background ratio.

Immunohistochemistry. (a) For immunolabelling performed on RABV infected brains, coronal sections (60 µm) were washed three times with 0.5% Triton-X100 (TX) in 1 × PBS (20 min each) and pre-incubated 1 h in a serum solution (goat serum 10% + 0.5% TX in 1 × PBS). The sections were washed three times with 1 × PBS and immersed in the primary antibody solution (rabbit anti-GFP antibody A11122, Invitrogen; 1/1,000 in 0.5% TX in 1 × PBS) for 24 h at 4 °C on a shaker. After washing four times with 1 × PBS, the sections were incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody, A11008 from Invitrogen; 1/1,000 diluted in 1 × PBS + 0.5% TX) for 2 h at room temperature. The brain sections were mounted in ProLong Gold Antifade mounting medium (Invitrogen/Molecular Probes) and covered by individual round glass coverslips of 18-mm diameter (0.17 ± 0.01 mm thick). (b) Immunolabelling for detection of amyloid plaques was performed as described above, using a primary antibody raised against human amyloid-beta peptides (polyclonal rabbit antibody, 1/500; ABCAM ab2539) and goat anti-rabbit secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488. (c) Immunohistochemistry to determine the cell types infected in the hippocampal CA3 area was performed on sections from lentivirus-infected mice as described above, using following antibodies: anti-NeuN (mouse Millipore MAB377, 1/400), anti-GFAP (rabbit Millipore AB5804, 1/1,000), donkey anti-mouse secondary antibody coupled Alexa Fluor 594 (1/200) and donkey anti-rabbit secondary antibody coupled Alexa Fluor 594 (1:200).

STED microscopy and morphometric analysis. Super-resolved images of spine morphology were obtained with a custom-built STED microscope with a nominal spatial resolution of 50 nm. All images were acquired in the stratum radiatum above the CA3b region as stacks of 10 z-sections with a step size of 192 nm and a pixel size of 40 nm × 40 nm. For spine counts and density calculations over large field-of-views (image from Fig. 2a left and data Fig. 2b), a home-built two-photon microscope, (λ_{exc} = 920 nm) equipped with a water-immersion objective (60X LUMFI, 1.1 NA, Olympus) was used as previously described⁴⁷. For more detailed analyses of spine morphology we used a home-built STED microscope. It was based on an inverted microscope (DMI 6000 CS Trino, Leica), using a pulsed-laser diode (PDL 800-D, Picoquant) for excitation (λ_{exc} = 485 nm, ~90 ps) and a Ti:Sa-OPO system (Chameleon, Coherent; OPO, APE) for fluorescence quenching (λ_{STED} = 595 nm, ~200 ps), as described previously⁴⁸. The pulses of originally 200 fs duration were stretched to ~300 ps by dispersion via a 100-m-long

polarization-preserving fiber (Schäfer + Kirchhoff, Hamburg, Germany). To create the STED focal doughnut, a polymeric phase plate (RPC Photonics, Rochester, NY) was introduced into the path of the expanded STED beam, imprinting a helical phase ramp onto the wavefront. The STED and excitation pulses were synchronized via external triggering of the laser diode, and the delay was adjusted with a custom-built electronic delay generator. Both beams were overlapped with a dichroic mirror (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany), and focused onto the fixed sample by an oil objective (HCX PL APO, 1.47 NA, $\times 100$; Leica, Wetzlar, Germany). A telecentric beam scanner (Yanus IV, TILL Photonics, Gräfelfing, Germany) with scan and tube lenses from the microscope manufacturer was used to steer the beam. Focusing by the objective was controlled via a piezo actuator (P-721 PIFOC, PI Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany). The fluorescence was collected episcopically using a dichroic mirror and a 525/50 band-pass filter, and imaged onto a multimode optical fiber connected to an avalanche photodiode (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer, Waltham, MA). Images were acquired using ImSpector software (courtesy of A. Schönle, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany). All morphological measurements were done using a custom-made plug-in for ImageJ where the spine length was measured from the base of the dendrite to the edge of the head, following the curvature of the spine neck. Spine neck width is reported as the average from multiple spine neck profiles, drawn orthogonal to the spine neck curvature. Spine head width was measured orthogonal to the axis of the spine neck. The length and width of each spine neck was determined by measuring the full width at half-maximum of a Gaussian fit applied to line profiles across the spine neck.

To evaluate the impact of nanoscale alterations in spine morphology on diffusional coupling, we calculated the compartmentalization factor, which is defined as:

$$CF = \frac{V \cdot L}{A}$$

where V is the spine head volume, L the spine neck length and A the cross-sectional area of the spine neck. compartmentalization factor corresponds to the time constant τ of diffusional recovery ($\tau = \frac{V \cdot L}{A \cdot D}$) after a step change in concentration of a molecule with a diffusion coefficient D , serving as a quantitative measure of the degree of biochemical compartmentalization of a synapse⁴⁹.

Binding assays. On collection, the two hippocampi from each mouse were stored at -80°C . The hippocampi were then unfrozen in ice-cold Krebs solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM glucose and pH 7.4) and sliced in a McIlwain chopper (800 μm). Each individual slice was then placed on a rubber surface, over a drop of ice-cold Krebs solution, and CA3 subslices were manually dissected under microscope magnification⁵⁰. To purify synaptic membranes, the CA3 subslices from each animal were placed in an eppendorf with 500 μl of ice-cold sucrose solution (0.32 M) containing 50 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA and 1 mM dithiothreitol, pH 7.6, homogenized with a micro-Potter-Elvehjem and centrifuged at 3,000g for 10 min at 4°C . The supernatants were collected, centrifuged at 14,000g for 20 min at 4°C and the pellet was resuspended in 500 μl of a 45% (v/v) Percoll solution made up in a Krebs solution. After centrifugation at 14,000g for 2 min at 4°C , the top layer was removed (synaptosomal fraction), washed in 500 μl of Krebs solution and vigorously resuspended in 500 μl of Tris/Mg solution (50 mM Tris and 10 mM MgCl_2 , pH 7.4). The mixtures were centrifuged at 30,000g for 30 min to pull-down synaptic membranes and resuspended in 500 μl of Tris/Mg solution with 4 U ml^{-1} adenosine deaminase (Sigma), to remove endogenous adenosine. We have previously shown that the synaptic membranes provide an enrichment of markers of nerve terminals (SNAP-25, syntaxin-1) and of the postsynaptic density (PSD-95), which display a $<2\%$ contamination with astrocytic material, as gauged by the western blot evaluation of GFAP in the purified synaptosomes used to prepare synaptic membranes⁵¹.

To evaluate the binding density of $A_{2A}R$, we used ^3H -SCH58261 [2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine], which binds selectively cortical $A_{2A}R$ (ref. 52), whereas the binding density of $A_{1}R$ was determined using ^3H -1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX). Binding of ^3H -SCH58261 (specific activity of 77 Ci mmol^{-1} ; prepared by Amersham and generously offered by Dr Ennio Ongini, Shering-Plough, Milan, Italy) or of ^3H -DPCPX (specific activity of 102.1 Ci mmol^{-1} ; DuPont NEN, Boston, MA, USA) was for 2 h at room temperature with $6.5\text{--}13.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of synaptosomal protein in a final volume of 200 μl in Tris/Mg solution containing 4 U ml^{-1} adenosine deaminase with a single supra-maximal and selective concentration of ^3H -DPCPX (10 nM) or of ^3H -SCH58261 (6 nM). Specific binding was determined by subtraction of the non-specific binding, which was measured in the presence of $1 \mu\text{M}$ 8-[4-[(2- aminoethyl)amino]carbonylmethyl-oxyphenyl]xanthine (XAC), a mixed $A_1/A_{2A}R$ antagonist. Each binding assay data point was performed in duplicate. The binding reactions were stopped by vacuum filtration through glass fibre filters (B filters) using a 12-wells-Millipore harvester. The filters were then placed in scintillation vials and 4 ml of scintillation liquid cocktail (AquaSafe 500 Plus Ready Safe) was added. Radioactivity was determined after at least 12 h with a counting efficiency of 55–60% using a Tricarb 2900TR liquid scintillation analyser (Perkin Elmer). After subtraction of the non-specific from the total binding, the disintegration per min values corresponding to the specific binding were converted into absolute amounts fmol of bound ^3H -

SCH58261 or ^3H -DPCPX, which was normalized per mg of protein, quantified with the BCA method.

Behavioural experiments. The behavioural tasks, namely the modified Y-maze and object location tasks, were performed as a measurement of short-term spatial memory (to focus on CA3 region) and based on the innate preference of rodents to explore novelty. All the behavioural tests were performed during the light phase of the circadian cycle (between 08:30–02:00 hours), under red/low light (12lx). The intraperitoneal injection of SCH58261 was performed around 06:00 hours, to avoid the repercussion of the acute effect of the drug in the behavioural tasks and in the animal sleeping cycle. Between each trial the apparatus was cleaned with a 10% ethanol solution to avoid odour cues. At the end of the training trial, the mice were removed from the apparatus and kept in an individual cage during the inter-trial intervals. Mice were first tested in the object displacement test and then tested 12 h later in the modified Y-maze test, based on our previous validation that there is no influence of the object displacement test on the modified Y-maze test with this temporal interval either in control mice or in mice with memory deficits (Rial *et al.*⁵³). All experimental data was analysed using the ANY-maze video tracking system, Stoelting, US.

Modified Y-maze. The Y-maze apparatus consisted of three arms (42 cm long, 15 cm height and 8 cm large) made from impermeable black formica with a brown floor and was placed at the ground level. During the training phase, one arm was blocked by a removable door. In this phase the mice were positioned in the start arm, facing the center of the maze and allowed to explore only two arms (start and other) for 8 min. The test was performed 30 min later (with the door blocking the novel arm removed) and the animal were placed again in the start arm and allowed to explore the three arms during 8 min. The number of entries and the time spent in each arm was measured, as previously described^{53,54}.

Object displacement/object location. The object displacement protocol used was carried out as previously described^{53,54}. Briefly, the mice were first habituated for a 10-min period in the empty apparatus, a box composed by transparent plexiglass walls and brown floor (50 cm wide, 50 cm deep and 40 cm high), placed at the ground level. In the training phase, performed 24 h after the habituation phase, two identical plastic 50 ml Falcon tubes filled with dyed sterile water were placed 15 cm away from the walls of the arena. The mice were placed at the center of the apparatus and allowed to explore these two identical objects for 10 min, and we recorded the time spent sniffing/whisking or looking (≤ 1 cm) at the objects. The test was performed 30 min later, where one of the objects was moved creating a different spatial combination for the animal to explore during 5 min; again the time spent exploring the objects in the novel and familiar locations was recorded.

All locations for the objects were counterbalanced among the groups. The displacement index was determined by the percentage of the time spent exploring the displaced object (T_{novel}) over the time spent exploring both objects. Displacement index is defined as $(T_{\text{novel}} \times 100)/(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$.

SCH58261 injections (0.1 mg kg^{-1} , i.p.) were done each day, for 7 consecutive days before behavioural evaluation. Electrophysiological experiments were not carried out on animals used for behavioural experiments.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed with Prism6 GraphPad Software. Values are presented as mean $\pm$ s.e.m. in the text and figure legends. The data normality was tested using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. If data was normally distributed, a Student's t -test or one-way and two-way analysis of variance (ANOVA; to compare more than two independent groups) was performed; otherwise, a Mann-Whitney test was used (to compare two groups) and Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test (to compare more than two groups). Within-cell comparisons were made with Wilcoxon matched pairs test using non-normalized values. Data distributions were analysed using the Kolmogorov-Smirnov test with the data from wt mice as reference. Statistical differences were considered significant at $P < 0.05$.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on request.

References

1. Sperling, R. Functional MRI studies of associative encoding in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1097**, 146–155 (2007).
2. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789–791 (2002).
3. Kesner, R. P. A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 78 (2013).
4. Nakazawa, K. *et al.* Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* **38**, 305–315 (2003).
5. Rolls, E. T. & Treves, A. The neuronal encoding of information in the brain. *Prog. Neurobiol.* **95**, 448–490 (2011).
6. Marchetti, C. & Marie, H. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev. Neurosci.* **22**, 373–402 (2011).

7. Sheng, M., Sabatini, B. L. & Südhof, T. C. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4** (2012).
8. Malinow, R. New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 559–563 (2012).
9. Ritchie, K. *et al.* The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* **69**, 536–545 (2007).
10. Cao, C. *et al.* High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J. Alzheimers Dis.* **30**, 559–572 (2012).
11. Dall'Igna, O. P. *et al.* Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* **203**, 241–245 (2007).
12. Li, P. *et al.* Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Mol. Psychiatry* **20**, 1339–1349 (2015).
13. Albasanz, J. L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I. & Martin, M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **18**, 211–219 (2008).
14. Orr, A. G. *et al.* Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat. Neurosci.* **18**, 423–434 (2015).
15. Garcia-Alloza, M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24**, 516–524 (2006).
16. Henze, D. A., Card, J. P., Barrionuevo, G. & Ben-Ari, Y. Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J. Neurophysiol.* **77**, 1075–1086 (1997).
17. Debanne, D., Gähwiler, B. H. & Thompson, S. M. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol. (Lond)* **507**(Pt 1): 237–247 (1998).
18. Wickersham, I. R., Finke, S., Conzelmann, K.-K. & Callaway, E. M. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods* **4**, 47–49 (2006).
19. Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B. & Nägerl, U. V. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* **17**, 678–685 (2014).
20. Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 383–400 (2013).
21. Hu, N.-W., Klyubin, I., Anwyl, R., Anwyl, R. & Rowan, M. J. GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 20504–20509 (2009).
22. Rönick, R. *et al.* Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol. Aging* **32**, 2219–2228 (2011).
23. Li, S. *et al.* Soluble A oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic nr2b-containing nmda receptors. *J. Neurosci.* **31**, 6627–6638 (2011).
24. Talantova, M. *et al.* A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E2518–E2527 (2013).
25. Papouin, T. *et al.* Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* **150**, 633–646 (2012).
26. Canas, P. M. *et al.* Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by β -amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* **29**, 14741–14751 (2009).
27. Arendash, G. W. *et al.* Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience* **142**, 941–952 (2006).
28. Espinosa, J. *et al.* Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J. Alzheimers Dis.* **34**, 509–518 (2013).
29. Tebano, M. T. *et al.* Adenosine A2A receptors and metabotropic glutamate 5 receptors are co-localized and functionally interact in the hippocampus: a possible key mechanism in the modulation of N-methyl-D-aspartate effects. *J. Neurochem.* **95**, 1188–1200 (2005).
30. Um, J. W. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5Is a Coreceptor for Alzheimer Ab oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* **79**, 887–902 (2013).
31. Trinchese, F. *et al.* Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann. Neurol.* **55**, 801–814 (2004).
32. Rebola, N., Carta, M., Lanore, F., Blanchet, C. & Mulle, C. NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat. Neurosci.* **14**, 691–693 (2011).
33. Barria, A. & Malinow, R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* **48**, 289–301 (2005).
34. Hanson, J. E., Pare, J.-F., Deng, L., Smith, Y. & Zhou, Q. Altered GluN2B NMDA receptor function and synaptic plasticity during early pathology in the PS2APP mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **74**, 254–262 (2015).
35. Schneider, L. S., Dagerman, K. S., Higgins, J. P. T. & McShane, R. Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **68**, 991–998 (2011).
36. Cunha, R. A. & Agostinho, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J. Alzheimers Dis.* **20**(Suppl 1): S95–S116 (2010).
37. Zezula, J. & Freissmuth, M. The A2A-adenosine receptor: a GPCR with unique features? *Br. J. Pharmacol.* **153**(Suppl 1): S184–S190 (2008).
38. Dai, S. S. *et al.* Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury. *J. Neurosci.* **30**, 5802–5810 (2010).
39. Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R. A. & Mulle, C. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **57**, 121–134 (2008).
40. Yu, L. *et al.* Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res.* **1000**, 156–173 (2004).
41. Rombo, D. M. *et al.* Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. *Hippocampus* **25**, 566–580 (2014).
42. de Almeida, L. P., Zala, D., Aebischer, P. & Déglon, N. Neuroprotective effect of a CNTF-Expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **8**, 433–446 (2001).
43. Gonçalves, N., Simões, A. T., Cunha, R. A. & de Almeida, L. P. Caffeine and adenosine A2A receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado-Joseph disease. *Ann. Neurol.* **73**, 655–666 (2013).
44. Costenla, A. R. *et al.* Enhanced role of adenosine A2A receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 12–21 (2011).
45. Rebola, N., Canas, P. M., Oliveira, C. R. & Cunha, R. A. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience* **132**, 893–903 (2005).
46. Haberl, M. G. *et al.* An anterograde rabies virus vector for high-resolution large-scale reconstruction of 3D neuron morphology. *Brain Struct. Funct.* **220**, 1369–1379 (2015).
47. Bethge, P., Chéreau, R., Avignone, E., Marsicano, G. & Nägerl, U. V. Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophys. J.* **104**, 778–785 (2013).
48. Tønnesen, J., Nadrigny, F., Willig, K. I., Wedlich-Söldner, R. & Nägerl, U. V. Two-Color STED microscopy of living synapses using a single laser-beam pair. *Biophys. J.* **101**, 2545–2552 (2011).
49. Wijetunge, L. S., Angibaud, J., Frick, A., Kind, P. C. & Nägerl, U. V. Stimulated emission depletion (STED) microscopy reveals nanoscale defects in the developmental trajectory of dendritic spine morphogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **34**, 6405–6412 (2014).
50. Cunha, R. A., Milusheva, E., Vizi, E. S., Ribeiro, J. A. & Sebastião, A. M. Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **63**, 207–214 (1994).
51. Quiroz, C. *et al.* Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *Sci. World J.* **9**, 1321–1344 (2009).
52. Lopes, L. V. *et al.* Binding of the prototypical adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A1 and A2A receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 1006–1014 (2004).
53. Rial, D. *et al.* Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. *PLoS ONE* **9**, e114216 (2014).
54. Kaster, M. P. *et al.* Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 7833–7838 (2015).

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Santa Casa da Misericórdia, the Fondation France Alzheimer, the Agence Nationale de la Recherche (contract SynflAD), the Conseil Régional d'Aquitaine and the Labex Brain. Cellular imaging was in part performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging. We thank Nelson Rebola and Mario Carta for their help with electrophysiology and their constant scientific support, Yoon Cho for her help with behavioural analysis and Melanie Ginger for the rabies virus.

Author contributions

S.V.S. and P.Z. performed the electrophysiology recordings. S.V.S. performed all the electrophysiology analysis. S.V.S. and M.G.H. performed all stereotaxic injections and subsequent immunolabellings. P.B. and V.N. performed STED acquisitions. P.B. and M.G.H. made the imaging analysis. C.L. and N.G. performed and analysed behaviour

experiments. A.G. performed immunostaining anti amyloid-beta plaques. F.Q.G. prepared synaptic membranes. C.B. provided help with electrophysiology analysis. R.A.C. performed binding assays and analysis, and helped with discussion. N.Go. produced shRNA and scrRNA lentiviral constructs and performed expression experiments. M.G.H. and A.F. provided rabies virus. C.M. provided supervision, guided the project and wrote the manuscript together with S.V.S. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: the authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

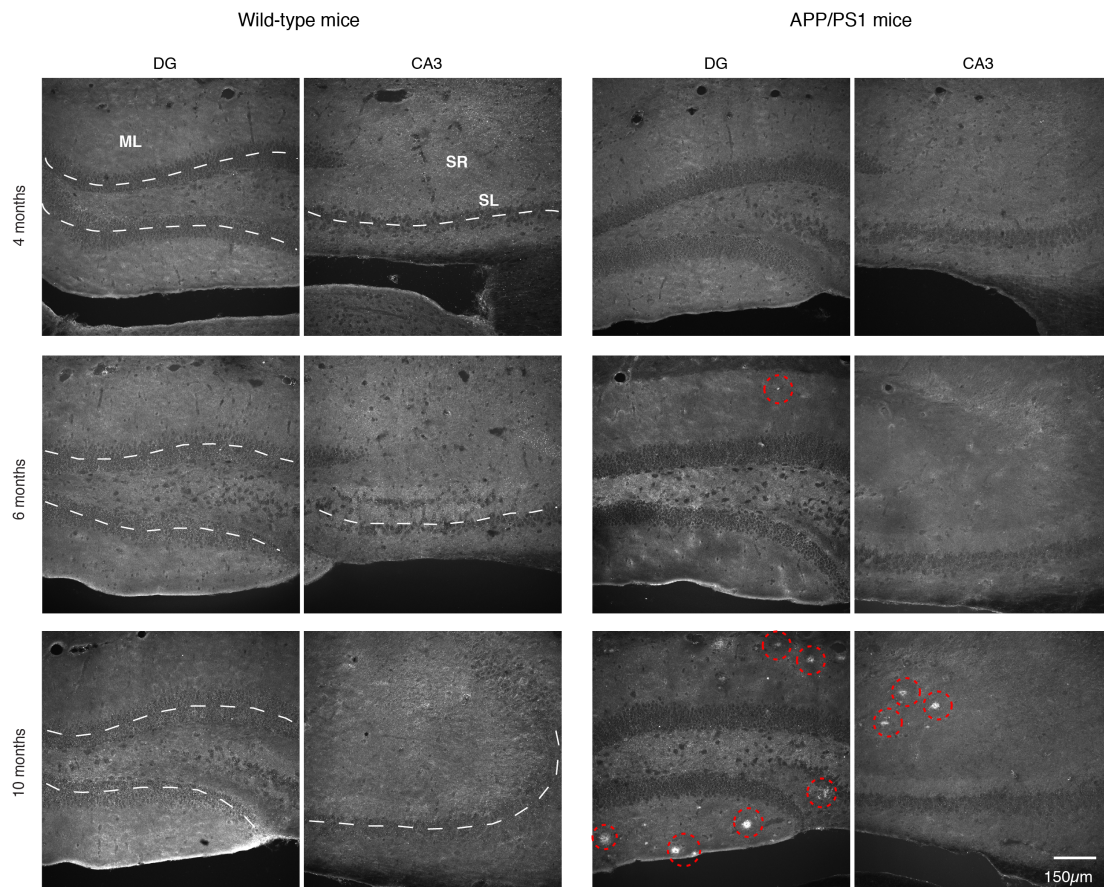
How to cite this article: Viana da Silva, S. *et al.* Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A_{2A} receptors. *Nat. Commun.* 7:11915 doi: 10.1038/ncomms11915 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

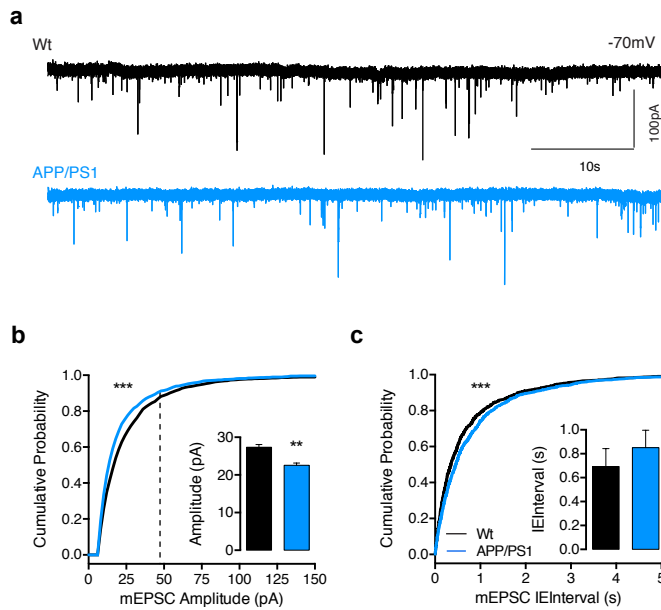
SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1

Representative immunohistochemistry of Aβ insoluble deposits in the hippocampus of APP/PS1 mice. At 4 and 6 months, Aβ plaques are absent from the CA3 region and only in rare cases ($n = 1$ slice out of 40, from 4 APP/PS1 mice) present in the molecular layer (ML) of the DG. After 10 months numerous plaques were visible in the ML and *stratum radiatum* (SR). We never observed Aβ plaques in the *stratum lucidum* (SL).

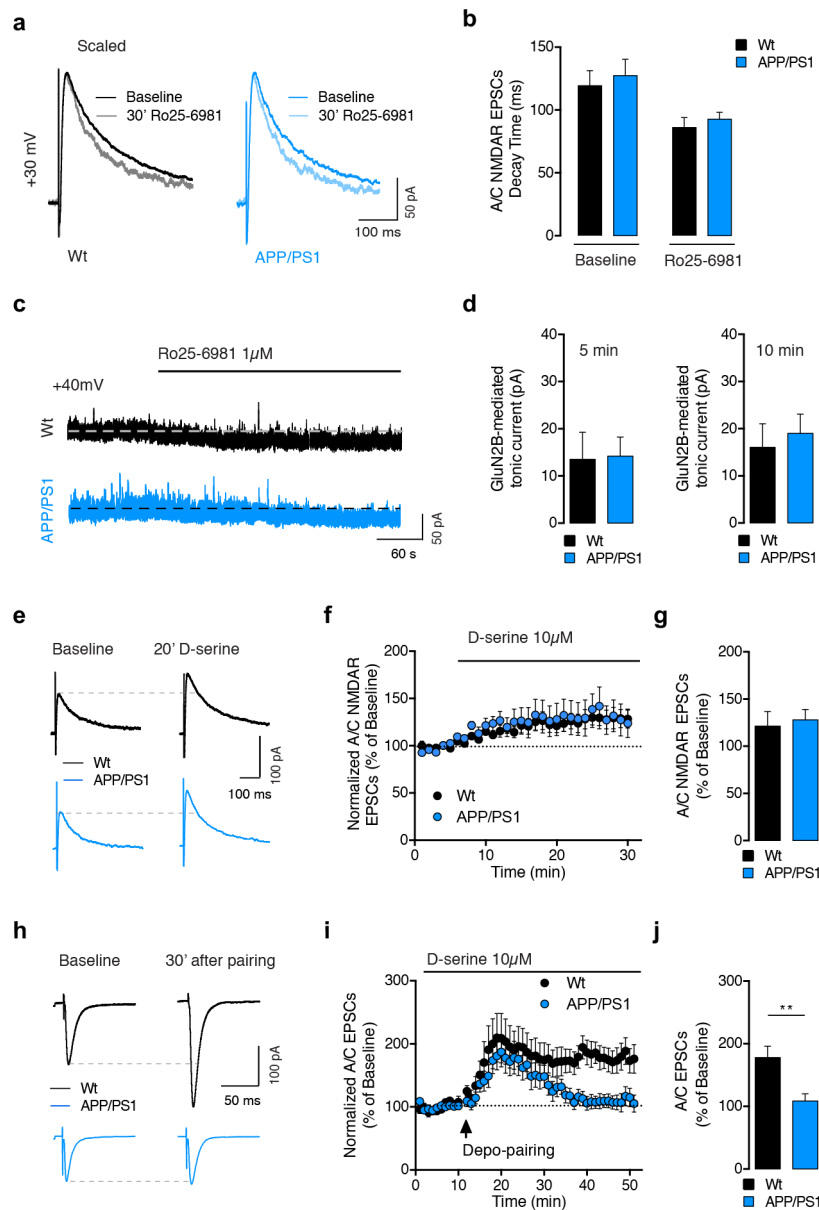


Supplementary Figure 2

(a) Representative recordings of mEPSCs obtained from CA3 PCs from Wt and APP/PS1 mice. CA3 PCs were held at -70 mV in the presence of bicuculline (10 μ M) and TTX (1 mM).

(b) Cumulative probability analysis of mEPSCs amplitude showed a difference between Wt and APP/PS1 mice (KS test $p < 0.0001$); the first 100 events of 15 cells per genotype are plotted. Average amplitude of mEPSCs is 28.7 ± 1.8 pA in Wt mice ($n = 15$ cells, 8 mice) and 22.6 ± 1.3 pA in APP/PS1 mice ($n = 15$ cells, 9 mice).

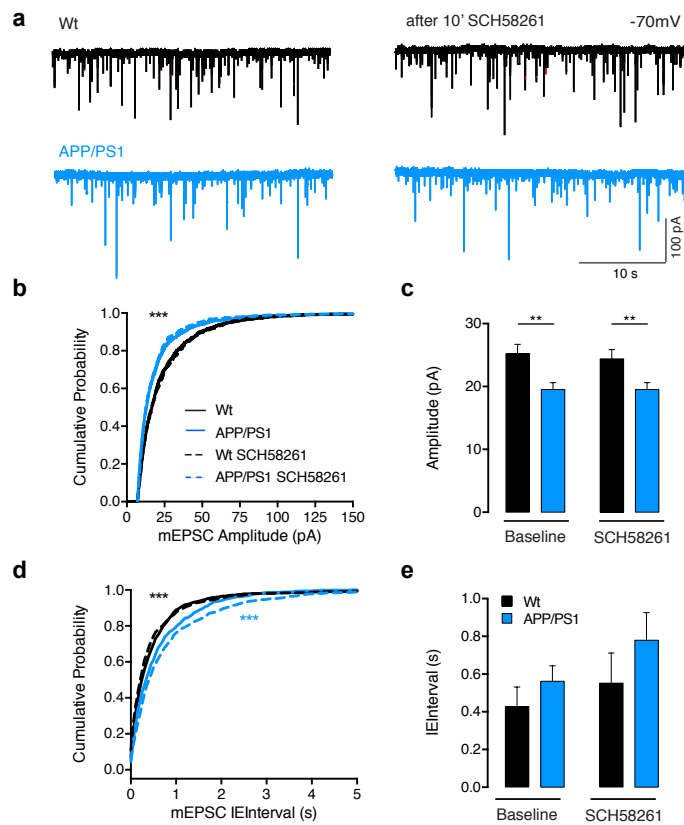
(c) Cumulative probability analysis of mEPSCs inter-event interval (IEI) showed a difference between Wt and APP/PS1 mice (KS test $p < 0.0001$); the first 100 events of 15 cells per genotype are plotted. Nevertheless the average frequency of mEPSCs is not different between Wt mice (0.7 ± 0.2 s IEI, $n = 15$ cells, 8 mice) and in APP/PS1 mice (0.9 ± 0.1 s IEI, $n = 15$ cells, 9 mice).



Supplementary Figure 3

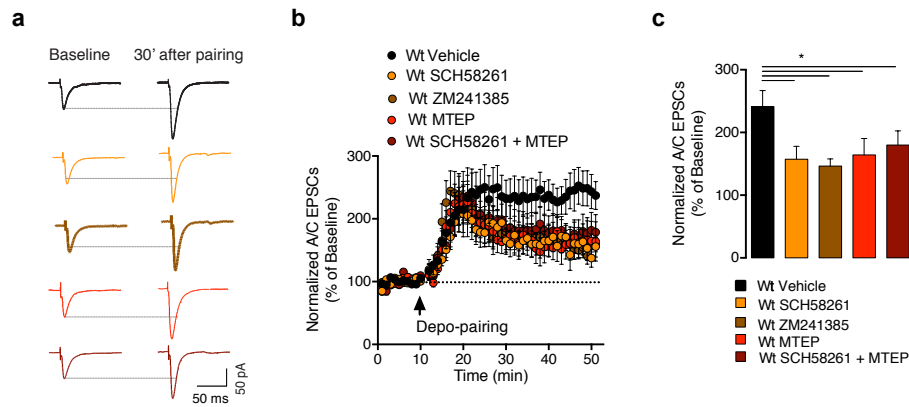
(a) Average traces representing alterations in the decay time of A/C NMDAR-EPSCs after 30 min of Ro25-6981 action: darker traces correspond to an average during baseline period and lighter traces (scaled) to the average after 30 min of drug action. **(b)** Summary plot of the mean decay time of A/C NMDAR-mediated EPSCs shows that the effect of 1 μ M Ro25-6981 ($p = 0.002$, two-way ANOVA with repeated measures (RM)) is not different between Wt mice ($n = 13$) and in APP/PS1 mice ($n = 16$, $p = 0.488$, two-way ANOVA RM and Sidak's multiple comparisons test). Accordingly, Ro25-6981 application reduced the decay time in Wt mice ($Wt_{Baseline} 119.3 \pm 11.9$ ms, $Wt_{Ro25-6981} 86.0 \pm 7.9$ ms, paired t-test $p = 0.035$; $APP/PS1_{Baseline} 127.3 \pm 13.1$ ms; $APP/PS1_{Ro25-6981} 92.7 \pm 5.4$ ms, paired t-test $p = 0.025$). **(c)** Representative examples of the shift in holding current observed at +40 mV in response to Ro25-6981

revealing the tonic activation of extrasynaptic GluN2B-containing NMDAR. **(d)** Summary bar graph of the extrasynaptic currents measured in (c) from CA3 PCs from Wt ($n = 10$) and APP/PS1 mice ($n = 8$, $p = 0.927$, Mann-Whitney test). Data calculated as the difference between last min of baseline and the last of 6 or 11 min after Ro25-6981 application. **(e)** Representative traces of A/C NMDAR-EPSCs measured at baseline and 20 min after D-serine application. **(f)** Summary plot describing the time course of A/C NMDAR-EPSCs potentiation after bath application of D-serine ($10 \mu\text{M}$). A/C NMDAR-mediated EPSCs (recorded at 0.1 Hz) were normalized to the mean amplitude of the baseline. **(g)** Bar graph representing a similar increase in mean amplitude of A/C NMDAR EPSCs recorded between 20 to 30 min after drug application. Values are expressed as percentage of the baseline amplitude and show no statistic difference between the effects of this NMDAR co-agonist on Wt or APP/PS1 synapses (Wt $121.3 \pm 15.4 \text{ pA}$, $n = 8$; APP/PS1 $127.0 \pm 11.0 \text{ pA}$, $n = 8$; unpaired t-test $p = 0.632$). **(h)** Representative traces of average A/C EPSCs obtained during baseline and 30 min after the depo-pairing LTP protocol. **(i)** Summary time course of A/C LTP in the presence of D-serine. The LTP protocol was applied at the time indicated by the arrow. Slices were incubated with D-serine for 10 min before baseline recording and A/C AMPAR-mediated EPSCs were normalized to the mean amplitude of baseline. **(j)** Bar graph representing the effect of D-serine on A/C LTP. The LTP amplitude obtained in A/C synapses is different between APP/PS1 mice and Wt littermates ($n = 11$, $**p = 0.008$, unpaired t-test). D-serine did not rescue LTP in CA3 PCs of APP/PS1 mice (Supplementary Table 1). All electrophysiology recordings were performed in the presence of $10 \mu\text{M}$ bicuculline and $3 \mu\text{M}$ CGP55845.



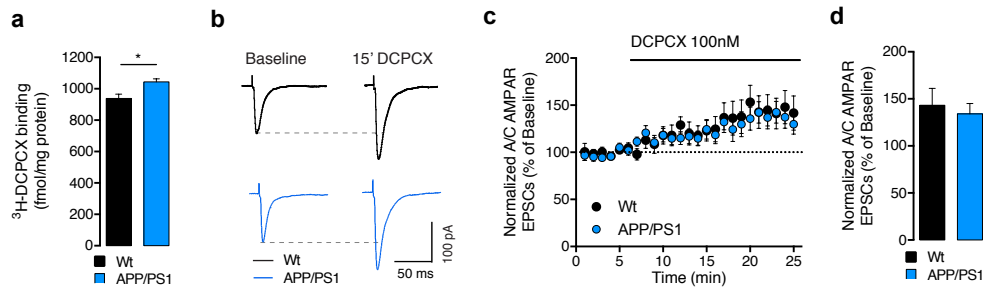
Supplementary Figure 4

(a) Representative recordings of mEPSCs obtained from CA3 PCs from Wt ($n = 11$ cells) and APP/PS1 mice ($n = 11$ cells) before and after a 10 min incubation period with SCH58261 (50 nM). CA3 PCs were held at -70 mV in the presence of bicuculline (10 μ M), CGP55845 (3 μ M) and TTX (1 mM). **(b)** Cumulative probability analysis of mEPSCs amplitude showed a difference between Wt and APP/PS1 mice (KS test *** $p < 0.0001$). For each cell, the last 100 events of a 10 min baseline period and the first 100 events after SCH58261 incubation are plotted. SCH58261 did not alter the amplitude's distribution of mEPSCs from both genotypes. **(c)** Summary bar graph of the average amplitude of mEPSCs during baseline and after SCH58261 incubation. Two-way ANOVA shows a genotype effect (** $p = 0.006$) while drug infusion has no effect. **(d)** Cumulative probability analysis of mEPSCs inter-event interval (IEI) showed an increase of IEI in APP/PS1 mice (KS test *** $p < 0.0001$). From each cell, the last 100 events of a 10 min baseline period and the first 100 events after SCH58261 incubation are plotted. Application of SCH58261 affected the distribution of mEPSCs IEI of APP/PS1 cells (KS test *** $p < 0.0001$) but had no effect on Wt cells. **(e)** Summary bar graph of the average IEI of mEPSCs during baseline and after SCH58261 incubation. Two-way ANOVA did not show statistical difference between genotypes or a drug effect.



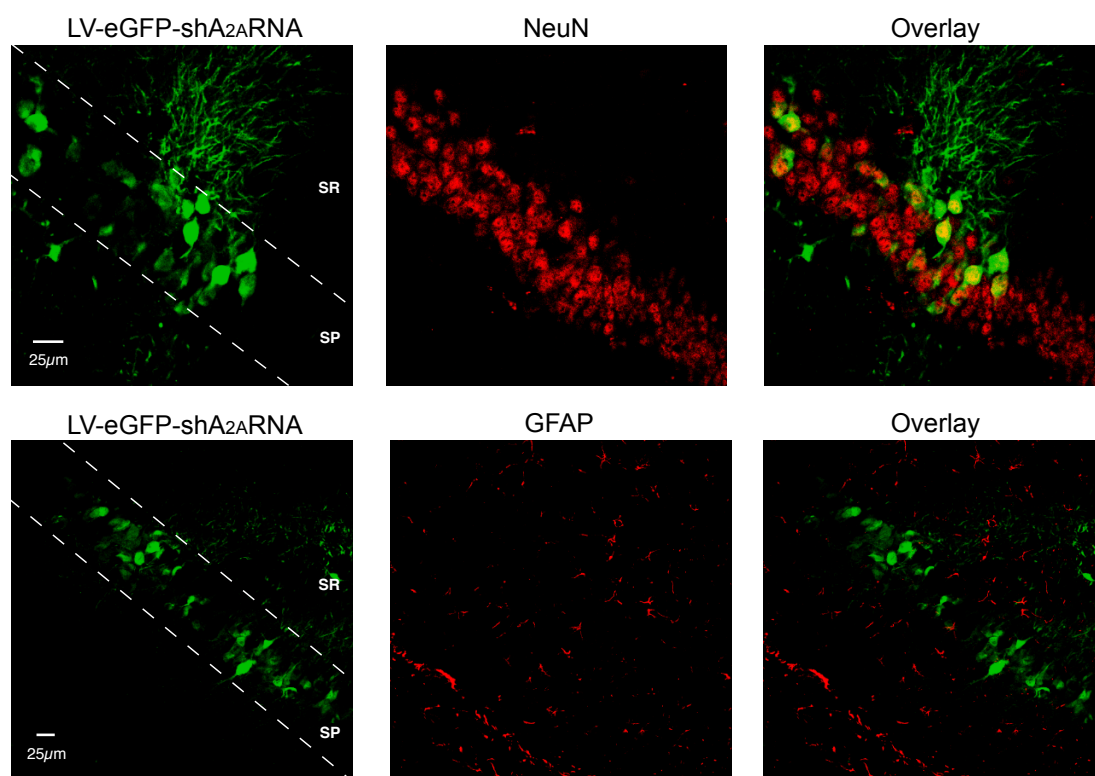
Supplementary Figure 5

(a) Example traces representing the average of A/C-EPSCs 10 min before and 30 min after depo-pairing LTP protocol in Wt animals in the presence of different antagonists of $A_{2A}R$ or mGluR5. **(b)** Summary time course of normalized A/C-EPSCs recorded from Wt mice during LTP protocol performed in the presence of either SCH58261 (50 nM), ZM241385 (50 nM), MTEP (10 μ M) or SCH58261 and MTEP together. **(c)** Bar graph representing the mean LTP amplitude recorded from 30 to 40 min after depo-pairing protocol represented in (b). Incubation for 10 min of Wt mice slices with SCH58261 ($n = 8$), ZM241385 ($n = 9$), MTEP ($n = 12$) or MTEP + SCH58261 ($n = 10$) reduced the A/C LTP levels when compared with Wt vehicle ($n = 9$, $p = 0.023$, Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test between each group and $Wt_{vehicle}$). See detailed values in Supplementary Table 1. All recordings were performed in the presence of 10 μ M bicuculline and 3 μ M CGP55845.



Supplementary Figure 6

(a) The density of A₁R shows a 10% increase in synaptic membranes prepared from the CA3 region of APP/PS1 mice compared to Wt littermates (n = 5, **p = 0.016, Mann-Whitney test). **(b)** Average traces of A/C AMPARs-EPSCs obtained at a stimulation frequency of 0.1 Hz during baseline and after 15 min from DCPCX (100 nM) application. Bicuculline (10 μM) and CGP55845 (3 μM) were present in the bath. **(c)** Summary plot of the time course of A/C AMPAR-EPSCs amplitude during the application of DCPCX in slices from Wt (n = 10) and APP/PS1 mice (n = 10). **(d)** Bar graph representing the similar increase of A/C AMPAR-EPSC amplitude after DCPCX application (p = 0.664, unpaired t-test). The amplitude of A/C AMPAR-mediated EPSCs was normalized to the mean amplitude of a 5 min baseline period and quantification was performed after 15 min of drug application.



Supplementary Figure 7

Representative confocal images after immunohistological labeling (red) with either the neuronal marker NeuN, or with the astrocytic marker GFAP, used to test the tropism of shA_{2A}RNA lentiviral vectors also expressing eGFP (green). Immunolabeling in the hippocampal CA3 region showed an almost exclusive colocalization of NeuN and virally infected eGFP positive cells (yellow, upper row). No colocalization was found between GFAP and eGFP infected cells (bottom row). The data are representative of 3 Wt mice analyzed. SP: *stratum pyramidale*, SR: *stratum radiatum*.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplemental Table 1 (related to Figures 1, 4, 6, 8, Supplementary figures 3 and 4)

Genotype	Treatment*	n	LTP level (%) (30 – 40min)	SEM	LTP?	p value
Wt	-----	11	224.9	27.9	Yes	0.005
APP/PS1	-----	10	90.7	9.8	No	0.432
Wt	D-serine	11	177.8	18.3	Yes	0.001
APP/PS1	D-serine	13	108.5	11.4	No	0.735
Wt	SCH58261	8	157.4	20.7	Yes	0.016
APP/PS1	SCH58261	11	159.7	15.5	Yes	0.003
Wt	ZM241385	9	146.4	11.3	Yes	0.008
APP/PS1	ZM241385	12	165.9	20.8	Yes	0.002
Wt	MTEP	12	164.3	26.1	Yes	0.002
APP/PS1	MTEP	12	163.6	27.9	Yes	0.016
Wt	SCH + MTEP	10	179.9	22.8	Yes	0.002
APP/PS1	SCH + MTEP	11	162.5	18.3	Yes	0.005
Wt	Vehicle (DMSO)	9	241.1	25.8	Yes	0.004
APP/PS1	Vehicle (DMSO)	11	98.2	8.6	No	0.520
APP/PS1	shRNA ⁻	7**	92.1	9.2	No	0.844
APP/PS1	shRNA ⁺	7**	173.7	20.3	Yes	0.008
APP/PS1	scrRNA ⁺	9	104.9	8.0	No	0.734
APP/PS1	scrRNA ⁺ + SCH	7	168.1	6.3	Yes	0.025
APP/PS1	shRNA ⁺ + SCH	9	173.4	14.7	Yes	0.002

Table 1 – Presence of LTP was evaluated by within-cell comparisons made with Wilcoxon match pairs test in raw non-normalized values between baseline values (average of 10 min) and the values obtained after applying the LTP protocol (30-40 min).

* all drugs were applied 5-10 min prior whole-cell establishment and kept for the rest of the experiment. All drugs were diluted in DMSO (100 mM stocks).

** n = 9 until 30 min after LTP (20-30 min). 4 pairs of cells (shRNA⁻ and shRNA⁺) were from the same animal.

Supplementary Table 2 (related to Figure 2)

	Range	Mean	Median	SEM	n
Wt					
spine length (μm)	0.19 – 1.81	0.82	0.77	0.02	300 spines 4 mice
head width (μm)	0.19 – 1.06	0.44	0.40	0.01	
neck length (μm)	0.05 – 1.38	0.46	0.40	0.01	
neck width (μm)	0.07 – 0.26	0.137	0.133	0.001	
head volume * (μm^3)	0.003 – 0.26	0.029	0.022	0.002	
CF	0.025 – 25.82	1.35	0.66	0.13	
APP/PS1					
spine length (μm)	0.23 – 2.12	0.81	0.75	0.02	288 spines 4 mice
head width (μm)	0.19 – 1.06	0.49	0.46	0.01	
neck length (μm)	0.09 – 1.33	0.40	0.35	0.01	
neck width (μm)	0.06 – 0.27	0.151	0.151	0.002	
head volume * (μm^3)	0.003 – 0.2	0.039	0.030	0.002	
CF	0.032 – 11.05	1.35	0.76	0.10	

Table 2 – Detailed information for each spine parameter measured.

*Head volume was calculated from the major and minor axes of the spine head dimensions assuming a prolate spheroid. CF = compartmentalization factor

Supplementary Table 3

Compound	Supplier	Activity	Concentration
Bicuculline	Tocris/R&D	Competitive GABA _A R antagonist	10 μ M
CGP 55845	Tocris/R&D	Competitive GABA _B R antagonist	3 μ M
NBQX	Abcam	Competitive AMPAR/KAR antagonist	20 μ M
D-APV	Abcam	Competitive NMDAR antagonist	50 μ M
L-CCG-I	Tocris/R&D	Potent group II mGluR agonist	10 μ M
TTX citrate	Tocris/R&D	Na ⁺ channel blocker	1 μ M
Ro 25-6981	Abcam	Blocker of GluN2 _B containing NMDAR	1 μ M
SCH58261	Tocris/R&D	Competitive A _{2A} R antagonist	50 nM
MPEP	Abcam	Non-competitive mGluR5 antagonist	10 μ M
ZM241385	Abcam	Selective A _{2A} R antagonist	50 nM

Table 3 – List of compounds and corresponding concentration used in all electrophysiology experiments.