



HAL
open science

Dynamique des interactions entre excitation et inhibition périssomatique dans le circuit hippocampique normal et épileptique in vivo

Olivier Dubanet

► **To cite this version:**

Olivier Dubanet. Dynamique des interactions entre excitation et inhibition périssomatique dans le circuit hippocampique normal et épileptique in vivo. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0259 . tel-02495357

HAL Id: tel-02495357

<https://theses.hal.science/tel-02495357>

Submitted on 2 Mar 2020

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 SANTE

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Olivier Dubanet

**Dynamique des interactions entre excitation et inhibition périsomatique dans le circuit
hippocampique normal et épileptique *in vivo***

Sous la direction du Dr Xavier Leinekugel
Président du jury : Pr Pascal Branchereau

Soutenue le 21 novembre 2019

Membres du jury :

Dr Valérie Crépel
Dr Gilles Huberfeld
Dr Lisa Roux
Pr Pascal Branchereau

Directrice de recherche
Maître de conférences– praticien hospitalier
Chargée de recherche
Professeur des universités

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur

Titre : Dynamique des interactions entre excitation et inhibition périsomatique dans le circuit hippocampique normal et épileptique *in vivo*

Résumé : L'hippocampe est une structure essentielle pour les processus d'apprentissage et la mémoire. Le fonctionnement de ce circuit neuronal repose sur des interactions complexes entre cellules pyramidales glutamatergiques excitatrices et divers types d'interneurones GABAergiques inhibiteurs, dont on connaît mal les rôles exacts car il est très difficile d'étudier *in vivo* la fonction inhibitrice issue d'interneurones spécifiques. L'altération des interactions synaptiques entre cellules pyramidales et interneurones de l'hippocampe est de plus à la base de pathologies neurologiques telle que l'épilepsie, neurodéveloppementales telle que l'autisme, ou neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Parmi les différents types d'interneurones, ceux qui expriment la parvalbumine (PV) et dont l'axone projette sur les corps cellulaires (inhibition périsomatique) des cellules pyramidales ont une organisation anatomique qui les rend particulièrement efficaces pour bloquer la décharge de potentiels d'action chez leurs cellules cibles. C'est la raison pour laquelle on considère qu'ils jouent un rôle particulièrement important non seulement dans le codage de l'information (en contrôlant quelle cellule est en mesure ou non de décharger) mais aussi dans l'équilibre du circuit, pour éviter que l'excitation réciproque entre cellules pyramidales ne dégénère en crise d'épilepsie. L'efficacité de cette inhibition dite périsomatique dépend largement du gradient électrochimique des ions chlorure (Cl⁻), c'est à dire la combinaison entre le potentiel membranaire et la répartition des ions Cl⁻ entre l'intérieur et l'extérieur du neurone cible. Or, ces paramètres ne cessent de changer au fil de l'activité neuronale, et il a même été démontré que le gradient Cl⁻ pouvait s'inverser, générant un effet paradoxalement excitateur de la transmission GABAergique. Ce phénomène, qui participerait à la mise en place physiologique des circuits neuronaux immatures, est aujourd'hui également considéré comme une source majeure de dérèglement des circuits neuronaux dans diverses pathologies comme l'épilepsie, l'autisme ou la schizophrénie. Il s'agit donc d'un champs de recherche aux implications cliniques directes, et la recherche de drogues permettant de restaurer un gradient Cl⁻ physiologique représente un espoir thérapeutique majeur, mais les données contradictoires de la littérature appellent à la recherche d'une évaluation directe, qui n'a pas été réalisée jusque-là faute de disposer d'une approche technique adéquate. Pendant ma thèse, par des techniques d'électrophysiologie, d'opto- et de pharmaco-génétique, j'ai contribué à la mise au point d'une nouvelle approche méthodologique sophistiquée d'évaluation de la

transmission GABAergique périssomatique dans l'hippocampe, à même de respecter la complexité des dynamiques de l'activité neuronale spontanée *in vivo*. Mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle fonctionnel des interneurons parvalbumine (PV) de l'inhibition périssomatique dans le circuit hippocampique adulte, dans les conditions physiologiques et dans deux modèles d'épilepsie chez la souris. J'ai ainsi pu détecter *in vivo* l'expression d'un GABA excitateur mais qui ne semble pas participer à la génération des crises aiguës car exprimé dans la période de silence post-ictale, ni à l'épileptogénèse car exprimé seulement de façon anecdotique une semaine post-status epilepticus, un stade auquel j'ai également observé que la majorité des neurones pyramidaux de CA3 n'étaient plus sous contrôle inhibiteur périssomatique. En plus de contribuer à mieux comprendre l'épileptogénèse, ces travaux pourraient servir de modèle pour l'évaluation de la contribution d'un GABA excitateur à diverses conditions pathologiques, et de l'efficacité réelle de diverses approches visant à moduler le gradient chlore pour restaurer une fonction inhibitrice *in vivo*.

Mots clés : Neurosciences ; électrophysiologie *in vivo* ; GABA ; épilepsie

Title : Dynamics of interactions between excitation and perisomatic inhibition in the normal and epileptic hippocampal circuit in vivo

Abstract : The hippocampus is a key structure for learning and memory. The function of this neuronal circuit is based on complex interactions between excitatory glutamatergic pyramidal cells and various types of inhibitory GABAergic interneurons. The precise roles fulfilled by interneuron subtypes is still unclear because it is challenging to study in vivo the inhibitory function of specific interneurons. Alterations of the synaptic interactions between pyramidal cells and interneurons in the hippocampus also underlie neurological pathologies such as epilepsy, neurodevelopmental diseases such as autism, or neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Among the different types of interneurons, those that express parvalbumin (PV) and project to pyramidal cell bodies (perisomatic inhibition) are particularly efficient in blocking action potential generation in their target cells. PV interneurons therefore play a central role in neuronal coding (by controlling which cell can fire or not) but also in the balance between global excitation and inhibition within the circuit, prevention runaway excitation between interconnected pyramidal cells and the generation of epileptic seizure. Functional perisomatic inhibition directly depends on Cl⁻ electrochemical gradient, or the interaction between membrane potential and Cl⁻ distribution across the membrane of the target neuron. However, these parameters change continuously during neuronal activity, and it has been shown that the Cl⁻ gradient can be reversed, resulting in paradoxically excitatory GABAergic transmission. This phenomenon, which contributes to the physiological maturation of neuronal circuits during early development, is also considered as a major source of neuronal circuit dysfunction in various pathologies such as epilepsy, autism or schizophrenia. This field of research is therefore clinically relevant, and the research for drugs restoring a physiological Cl⁻ gradient is very active. However, a direct assessment of the excitatory GABA hypothesis has been hindered by the technical difficulty of probing endogenous GABAergic synaptic function in vivo, and contradictory data in the literature call for a direct evaluation. During my PhD, using electrophysiological, opto- and pharmaco-genetic techniques, I have contributed to develop a new and sophisticated methodological approach to evaluate the perisomatic GABAergic transmission in the hippocampus, respecting the complexity of spontaneous neuronal activity dynamics in vivo. I have studied the functional role of perisomatic inhibition from PV interneurons in the adult hippocampal circuit, in physiological conditions and in two

models of epileptic mice in which I was able to detect an excitatory GABAergic transmission in vivo. However, excitatory GABA was unlikely to participate in epileptogenesis because it was expressed only during the period of post-ictal silence after acute seizures, or in a potentially negligible minority of pyramidal cells one week post-status epilepticus during the latent period that precedes the emergence of chronic epilepsy, a stage during which I also demonstrated that the majority of CA3 pyramidal neurons were no longer under perisomatic inhibitory control. In addition to contribute to a better understanding of epileptogenesis, this approach constitutes an invaluable tool to quantify the actual in vivo efficacy of drugs designed to modulate Cl⁻ homeostasis and restore physiological GABAergic inhibition, thereby meeting high clinical and therapeutical expectations.

Keywords : Neurosciences ; in vivo electrophysiology ; GABA ; epilepsy

Remerciements

Mes premiers remerciements vont bien évidemment à **Xavier Leinekugel**, mon directeur de thèse. Merci pour ta disponibilité et tes nombreux conseils. Durant ces quatre années, tu m'as accompagné sur le chemin difficile de l'inhibition périsomatique dans l'hippocampe, il y a eu beaucoup d'embuches mais la passion que tu portes à ce métier et que tu as su me transmettre ont rendu les choses très agréables. Merci.

Je remercie également **Andreas Frick** de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury : **Valérie Crépel** et **Gilles Huberfeld** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que **Pascal Branchereau** et **Lisa Roux** d'avoir accepté de l'examiner.

Je remercie les différents membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer pendant ces quatre ans : **Mélanie, Kamila, Sourav, Vasiliky, Unai** (merci pour le chargeur), **Yang Ling** (merci pour le thé), **Rafael** (ma petite chatte), **Arjun** (I am waiting for your push-up) et **Sree**.

Je tiens à remercier particulièrement **Kathy Lecrof** et **Guillaume Bony** qui m'ont beaucoup aidé pour le concours de l'école doctorale. Merci **Katy**, tu as toujours été là pour répondre à mes questions scientifiques (et autres), tu fais partie des personnes qui auront marqué ma thèse par leur bienveillance. **Guillaume**, tu as la capacité étonnante de te mouvoir sans un bruit ce qui m'a valu de belles frayeurs mais tu as également été là pour m'écouter et m'aider.

Bien évidemment je tiens à remercier tout particulièrement **Rémi Proville**. C'est difficile de trouver les mots, j'écrirai donc juste qu'il y a eu un avant et un après Rémi autant d'un point de vu professionnel que personnel.

Merci à **Isabel Del Pino**, tu étais toujours là pour papoter après une dure journée de manip. Merci à **Miguel Morales Navas**, philosophe, écrivain, musicien et neuroscientifique, ça a été un plaisir de te rencontrer. Merci à **Mari Carmen Medrano** avec qui j'ai commencé ma thèse et les enregistrements tête-fixée sur les souris Alzheimer (pas toujours très coopératives). Merci à **Maria Isabel Carreno Munuz** qui a illuminé le bureau de sa présence solaire.

Merci à **Arnaldo Ferreira Gomez Da Silva**. Ton coté bad-boy manouche portugais (oui c'est possible) cache un joueur de brawl-star d'une férocité sans égale et un très mauvais joueur de Mario Kart. Sans toi la fin de ma thèse n'aurait pas eu la même saveur.

Si mon laboratoire de thèse était celui d'Andreas j'ai passé beaucoup de temps dans celui de **Anna Beyeler** dont les différents membres ont bien voulu me laisser squatter leur machine à café, leur terrasse et un peu de leurs matériels.

Merci **Anna** pour tes nombreux conseils (notamment pour les figures) qui m'ont été bien utiles et pour m'avoir accepté comme un membre de ton équipe. Merci **Sébastien Delcasso** de m'avoir donné l'opportunité de déménager une baignoire en fonte de 200kg sur trois étages sans ascenseur un jour de canicule... ça a été une journée très sympa bizarrement. Merci **Débora Jacky**, tu m'as toujours aidé quand j'en avais besoin et un GRAND MERCI pour m'avoir fait découvrir ce merveilleux appareil à mini crêpe. Merci à la psychologue **Laura Supiot**, son cabinet était ouvert de 9h jusqu'à tard dans la soirée dans la salle de patch, tes nombreux patients et moi-même peuvent témoigner de ta grande capacité d'écoute et de ta gentillesse. Je remercie également tous les étudiants qui sont passés dans le laboratoire Anna notamment **Annaëlle, Maxime et Adrien**.

Deux personnes de ce labo ont été assez sympas pour bien vouloir me suivre dans une aventure musicale au sein d'un groupe de rock : les **Gangaroo**. Merci à **Béa** chanteuse espagnole émérite qui, par sa présence solaire, a su égayer le labo et les répétitions. Merci **Pierre**, dont les qualités de batteur n'ont d'égal que la beauté hypnotisante de sa moustache. A ces joyeux lurons n'oublions pas **Vlad**, cette petite boule d'énergie à la voix exceptionnelle et aux rifts de guitare inspirés et bien-sûr **Jami** « Petrucci » soliste d'une grande virtuosité. Je n'oublierai jamais ces répétitions qui ont été une bouffée d'oxygène durant les durs moments de la thèse.

Je tiens à remercier tous mes amis qui m'ont supporté durant ces 4 ans de thèse et avec qui j'ai pu décompresser quand il le fallait. **Olivier, Florian, Emilie², Antoine le demi roux, Théo, Clem², Benoit, Zied Djerba, Xavier, Lison, François, Anne-Louise Francis, Amaury, Cyrielle, Audrey, Bastien, Heimana, Kim, Rémi, Camille, Vinceninouchet**.

Je remercie finalement ma famille, ma mère (**Brijou**) et ma sœur **Laure** qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles et sans qui je serais perdu.

Enfin, une dernière ligne pour mon père **Jacques**, à qui je dédie ce travail.

Tables des abréviations :

AI : anomalie interictale

AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

ATP : Adénosine-triphosphate

CA : Corne d'Ammon

CaCC : Ca²⁺-activated Cl⁻ channels

CCK : Cholecystokinine

CE : Cortex Entorhinal

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CIC : Chloride channel

CR : Calrétinine

DAMGO : [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin

EEG : Electroencéphalogramme

ELT : épilepsie du lobe temporal

Fmr1 : fragile mental retardation

GABA : acide γ -aminobutyrique

GAD : glutamique décarboxylase

GD : Gyrus Denté

GIRK : G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current

IGF : insulin growth factor

KA : acide Kainique

KCC2 : Potassium-chloride transporter

LGAC : *Ligand-gated anion channels*

LIA : Large Irregular Activity

NCC : Sodium-chloride symporter

NKCC : Na-K-Cl cotransporter

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nNos : neuronal Nitric oxide synthases

NPY : Neuro-peptide Y

O-LM : oriens lacunosum-moleculare

PKC : Protéine kinase C

PLT : Potentialisation à Long Terme

PPSI : Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur

PV : parvalbumine

REM : Rapid Eyes Movement

SM-BDB : Septum Médian Bande Diagonale de Broca

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

SPWR : Sharp Waves Ripples

SST : Somatostatine

SWS : Slow Waves Sleep

VGluT : vesicular glutamate transporter

VIP : Peptide Intestinal Vasoactif

VRAC : volume-regulated anion channel

WNK : lysine deficient *protein* kinase

GRIA2 : Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunits

Table des figures

Figure 1 : La formation hippocampique.....	16
Figure 2 : Boucle synaptique de l'hippocampe.....	18
Figure 3 : Cellule pyramidale de CA1 et de CA3.....	19
Figure 4 : Différents types d'interneurones de l'aire CA1 de l'hippocampe.....	21
Figure 5 : Rôle de l'acétylcholine dans le contrôle de la dynamique de l'hippocampe.....	29
Figure 6 : Le rythme thêta hippocampique.....	31
Figure 7 : Les Sharp Waves ripples dans le circuit hippocampique.....	33
Figure 8 : La précession de phase.....	35
Figure 9 : Structure et localisation des récepteurs ionotropiques au GABA.....	49
Figure 10 : Les flux de chlore à travers la membrane plasmique et vésiculaires des neurones.....	41
Figure 11 : Effet du blocage des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 sur la concentration intracellulaire du chlore en conditions physiologiques.....	45
Figure 12 : Régulation développementale de l'homéostasie du chlore.....	47
Figure 13 : L'inhibition de KCC2 aggrave la réponse GABAergique évoquée en post-crise.....	97

Table des Matières

I-	Introduction.....	13
A-	Le circuit hippocampique, une structure modèle pour le codage, la mémoire et l'épilepsie.....	13
1-	Mémoire et codage dans l'hippocampe.....	13
a-	Le modèle hebbien des assemblées neuronales pour le codage et la mémoire associative.....	13
b-	Mémoire épisodique et codage spatial dans l'hippocampe.....	14
2-	Propriétés de la région CA3 hippocampique, archétype de circuit hebbien.....	16
a-	Le circuit hippocampique trisynaptique, CA1, CA3.....	16
b-	Différents types spécialisés d'interneurons inhibiteurs.....	20
i-	Contrôle des inputs excitateurs et de leur intégration par l'inhibition dendritique.....	21
i-	Contrôle de la décharge neuronale par l'inhibition périsonomatique.....	22
ii-	Récepteurs au glutamate et synapses excitatrices.....	24
iii-	Propriétés distinctes de la transmission excitatrice vers les interneurons et vers les cellules pyramidales.....	26
3-	Fonctionnement et dynamiques du circuit hippocampique pour le codage et la mémoire.....	27
a-	Alternance entre encodage et consolidation par deux configurations distinctes du circuit hippocampique.....	27
b-	Dynamiques temporelles de l'activité dans l'encodage et la plasticité : les rythmes cérébraux....	30
B-	Transmission GABAergique et régulation du chlore dans les conditions physiologiques.....	36
1-	Complexité de la transmission GABAergique.....	36
a-	Les récepteurs métabotropiques GABA-B.....	36
b-	Les récepteurs ionotropiques GABA-A, perméables au chlore.....	38
2-	Les principaux acteurs de l'homéostasie du Chlore.....	40
a-	Les canaux perméables au chlore.....	40
b-	Les transporteurs du chlore.....	42
3-	Inversion physiologique du gradient chlore dans le développement, GABA dépolarisant et excitateur	46
C-	Déficit inhibiteur et régulation du chlore dans l'épilepsie.....	51
1-	Epileptogénèse et ictogénèse clinique. L'épilepsie, une pathologie de la balance excitation/inhibition	51
2-	Epilepsie et GABA excitateur : un gradient chlore inversé ?.....	54
3-	Espoirs et difficultés dans la question de l'évaluation de la fonction inhibitrice et de la régulation du chlore dans la pathologie.....	55
I-	Résultats : Reduced and reversed spontaneous GABAergic synaptic transmission in the CA3 circuit of epileptic mice in vivo.....	58
II-	Discussion.....	94
III-	Références bibliographiques.....	99

I- Introduction

A- Le circuit hippocampique, une structure modèle pour le codage, la mémoire et l'épilepsie

1- Mémoire et codage dans l'hippocampe

a- *Le modèle hebbien des assemblées neuronales pour le codage et la mémoire associative*

Selon la théorie hebbienne, la représentation neuronale de l'information serait constituée d'assemblées cellulaires définies comme un ensemble de neurones déchargeant de façon simultanée et dont chaque élément représente un des attributs d'une même représentation mentale (Hebb 1949, McNaughton and Morris 1987, Buzsaki 1989, Milner 1993, Harris, Csicsvari et al. 2003, Klausberger and Somogyi 2008, Lansner 2009). Un neurone peut appartenir à plusieurs assemblées et être impliqué dans la représentation de différents stimuli ayant des caractéristiques communes. Cette puissance combinatoire, éventuellement démultipliée par la succession temporelle des décharges, est quasiment infinie. Un aspect important de la théorie des assemblées neuronales est celle de l'association temporelle (« *binding problem* »). Selon la théorie, pour être considérés (et reconnus par le cerveau) comme appartenant à une même assemblée, les neurones doivent décharger simultanément (ou presque), ce qui suppose un mécanisme sophistiqué de coordination de l'activité à l'échelle des différentes régions cérébrales. A titre d'exemple, supposons que des neurones distincts appartenant chacun à des régions corticales spécialisées s'activent respectivement en réponse à la couleur bleu, la couleur jaune, la forme ronde et la forme carrée. Lorsqu'un rond bleu est perçu, une assemblée sera constituée de neurones codant pour bleu et rond et activés simultanément. Maintenant, si un rond bleu et un carré jaune sont perçus simultanément, les deux assemblées s'activent. On parle alors de superposition « catastrophique » (von der Malsburg 1999) puisque l'activité simultanée de ces assemblées peut tout autant représenter un rond bleu et un carré jaune qu'un rond jaune et un carré bleu. Un moyen de résoudre ce problème est l'hypothèse de liage par synchronisation temporelle (Singer and Gray 1995). Selon cette hypothèse, les assemblées activées par les caractéristiques d'un même percept seraient liées par le timing d'activation des neurones (émission des spikes). Maintenant, si un rond bleu et un carré jaune sont perçus simultanément, les spikes émis par les neurones de l'assemblée codant pour la forme ronde seraient synchronisés avec ceux émis par l'assemblée codant pour la couleur bleue, à un instant distinct de ceux codant pour le jaune et la forme carrée. C'est donc la

synchronisation neuronale qui permettrait de définir les neurones engagés dans l'activation d'une assemblée. L'autre aspect essentiel de la théorie tient de la mémoire associative. La plasticité synaptique entre les cellules pyramidales excitatrices permettrait de renforcer les connexions entre neurones appartenant à la même assemblée, de telle sorte que l'assemblée peut être réactivée par une de ses parties.

Cette activation ultérieure synchrone des neurones appartenant à une même assemblée à partir de quelques-uns d'entre eux nécessite un cadre anatomique constitué de neurones interconnectés, qui déchargent ensemble dans une fenêtre temporelle compatible avec les contraintes de la plasticité synaptique Hebbienne. Cependant, la contrepartie de cette interconnectivité excitatrice, d'excitation mutuelle, est que le système peut s'emballer et dériver vers une hypersynchronie dont la conséquence clinique est la crise d'épilepsie (Marr 1971, Cossart, Bernard et al. 2005). Les circuits neuronaux ont donc besoin d'une inhibition puissante pour maintenir le système dans les limites physiologiques (aspect quantitatif) mais également pour exercer un contrôle précis de l'identité et du moment de décharge de chaque neurone, rôle que l'on pense dévolu aux interneurones. Cette coordination dans l'espace et le temps des interactions neuronales se fait au sein de rythmes cérébraux (Buzsaki 1989, Buzsaki and Chrobak 1995, Buzsaki and Freeman 2015). En effet, l'activité cérébrale est largement coordonnée par une variété d'oscillations couvrant diverses fréquences et régions anatomiques. De façon intéressante, différents rythmes cérébraux sont associés à des états comportementaux distincts, suggérant une configuration distincte des circuits neuronaux selon les besoins cognitifs spécifiques associés au comportement. La plupart de ces rythmes cérébraux sont basés sur une coordination précise entre neurones excitateurs et inhibiteurs dont le rôle serait de fournir une référence temporelle pour le codage et de fixer des fenêtres temporelles d'excitabilité précises pour la communication entre les différentes régions du cerveau. La fonctionnalité des circuits neuronaux repose donc sur un équilibre subtil entre l'excitation et l'inhibition, qui peut être altéré dans certaines conditions pathologiques.

b- Mémoire épisodique et codage spatial dans l'hippocampe

En 1935, un cas clinique devenu célèbre mit en lumière le rôle clé que joue la structure hippocampique dans la mémoire, et en fit la région de choix pour la recherche sur la théorie hebbienne des assemblées cellulaires. Dans le Connecticut, Henri Molaison souffre d'épilepsie chronique dont la source se trouve dans ses deux lobes temporaux. Le chirurgien W. B. Scoville

procède alors à une ablation bilatérale d'une large partie des hippocampes afin de traiter son épilepsie. Si les symptômes de l'épilepsie ont presque totalement disparus, il souffre par contre d'une grave amnésie antérograde l'empêchant de former de nouveaux souvenirs jusqu'à sa mort en 2008 (Scoville and Milner 1957). Depuis, de nombreux mécanismes clés à l'origine de ces processus au sein de cette structure ont été découverts et l'hippocampe continue à être une des structures les plus étudiées en Neurosciences. En 1973 la découverte majeure du phénomène de plasticité synaptique cérébrale a été réalisée par les travaux de Bliss et Lømo sur l'hippocampe de lapin (1973). Ils ont montré qu'une stimulation à haute fréquence des synapses excitatrices entraînait une augmentation persistante (pouvant durer plusieurs jours) de l'efficacité de la transmission synaptique (Bliss and Lomo 1973). Ce phénomène, appelé *Long-Term Potentiation* (LTP), a été plus tard mis en évidence dans d'autres régions du système nerveux central et périphérique des vertébrés. Mais surtout, l'observation d'un renforcement sélectif des synapses où l'activité pré et post-synaptique coïncide temporellement correspond au postulat principal de la théorie de Hebb sur la mémoire.

En parallèle à l'étude de la mémoire, de nombreux travaux ont montré que l'hippocampe jouait un rôle central dans la fabrication des cartes corticales et l'orientation spatiale chez les rongeurs. En effet, au sein de l'hippocampe certaines cellules s'activent lorsque l'animal occupe une position précise dans son environnement : ce sont les cellules de lieu ou place cells qui codent l'espace (O'Keefe and Dostrovsky 1971, O'Keefe and Conway 1978). La proportion des cellules dotées de sélectivité spatiale est de l'ordre de 30 à 50% dans l'hippocampe (Wilson and McNaughton 1993) soit environ 300 000 cellules actives pour coder un même environnement. La découverte de ces cellules de lieu a été suivie par l'identification des « border cells » et des « head direction cells » (Solstad, Boccara et al. 2008). Ces cellules aux propriétés de codage spécialisées sont considérées comme la base neuronale de la navigation et de l'orientation dans l'espace (Moser, Rowland et al. 2015). Un enjeu principal est de comprendre les propriétés structurelles des circuits neuronaux responsables de ces propriétés fonctionnelles.

2- Propriétés de la région CA3 hippocampique, archétype de circuit hebbien

a- Le circuit hippocampique trisynaptique, CA1, CA3

La structure de l'hippocampe fut décrite pour la première fois par Ramon y Cajal. Il proposa l'existence de types cellulaires distincts, individualisés et organisés en différentes couches posant les bases de la connectivité neuronale de l'hippocampe (Ramon y Cajal, 1911). Chez les mammifères, l'hippocampe est une structure bilatérale se situant dans le repli interne du lobe temporal et très conservée au cours de l'évolution. Cette structure est constituée de deux couches corticales qui s'enroulent l'une dans l'autre : la première est la Corne d'Ammon (CA) qui se compose de trois sous-régions distinctes, CA1, CA2, CA3. La deuxième partie est le gyrus denté (GD). (**Figure 1**)

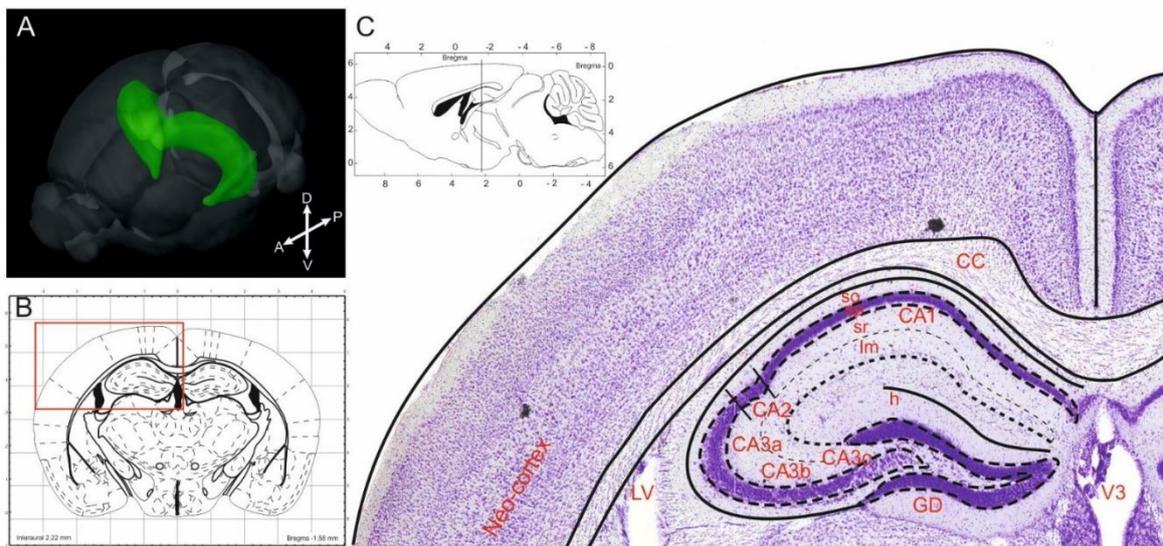


Figure 1 : hippocampe chez la souris

(A) Projection 3D des deux formations hippocampiques (vert) au sein d'un cerveau de souris. A = antérieur ; P = postérieur ; D = dorsal ; V = ventral. (B) coupe coronale d'un cerveau de souris au niveau de l'hippocampe dorsal où les différentes couches cellulaires sont visibles en (C) grâce à une coloration de Nissl qui marque les corps cellulaires neurones. CC = corps calleux ; CA = corne d'Ammon ; so = stratum oriens ; sp = stratum pyramidale ; sr = stratum radiatum ; lm = stratum lacunosum moleculare ; h = hilus ; GD = gyrus denté ; LV = lateral ventricul. Tiré de Brain atlas Paxinos et Allen brain atlas.

Les neurones hippocampiques sont divisés en deux populations. Les neurones principaux qui sont excitateurs et dont les connexions synaptiques projettent au moins en partie en dehors de leur région spécifique, et les interneurons qui sont inhibiteurs et dont la connectivité est essentiellement locale.

Les neurones principaux représentent approximativement 80% de la population neuronale de l'hippocampe et exercent une neurotransmission glutamatergique excitatrice. Ils se regroupent dans deux régions sous forme d'une couche cellulaire dense appelée *stratum pyramidale* dans la Corne d'Amon (neurones pyramidaux) et *stratum granulosum* dans le Gyrus Denté (neurones granulaires). Ces neurones reçoivent leurs afférences excitatrices uniquement au niveau de leurs dendrites, tandis que les afférences inhibitrices peuvent se localiser à divers endroits suivant le type d'interneurone qui les connecte: sur leur soma, les dendrites proximales et sur le cône d'émergence de l'axone. Ces neurones principaux forment une boucle synaptique mettant en jeu quatre groupes de neurones dans différentes structures intra et extra hippocampiques. Les neurones granulaires du Gyrus Denté reçoivent leurs afférences du cortex enthorinal (CE) via la voie perforante, et projettent vers les neurones principaux de CA3 via les fibres moussues. Les neurones de CA3 projettent vers CA1 par les collatérales de Schaffer. Les neurones pyramidaux de CA1 projettent dans la couche profonde du *subiculum* et dans le cortex enthorinal, bouclant ainsi ce qui est classiquement appelé le circuit trisynaptique de l'hippocampe (CE -> GD -> CA3 -> CA1) (Amaral and Witter 1989) (**Figure 2**). Les deux hippocampes droit et gauche sont également interconnectés au niveau de CA3 via la fimbria. Il est intéressant de noter que les neurones pyramidaux, en particulier de CA3, font également des connexions locales entre eux, dites collatérales récurrentes excitatrices. La théorie du circuit trisynaptique qui a participé au succès de l'hippocampe comme modèle expérimental par sa simplicité tend à être remis en cause et complexifié. Il existe par exemple une voie directe (dite temporo-amonique) de projection de la couche III du cortex enthorinal vers les dendrites distales des cellules pyramidales de CA1 (*stratum lacunosum moleculare*), et une projection directe de la couche II du cortex entorhinal vers CA3 (la voie perforante).

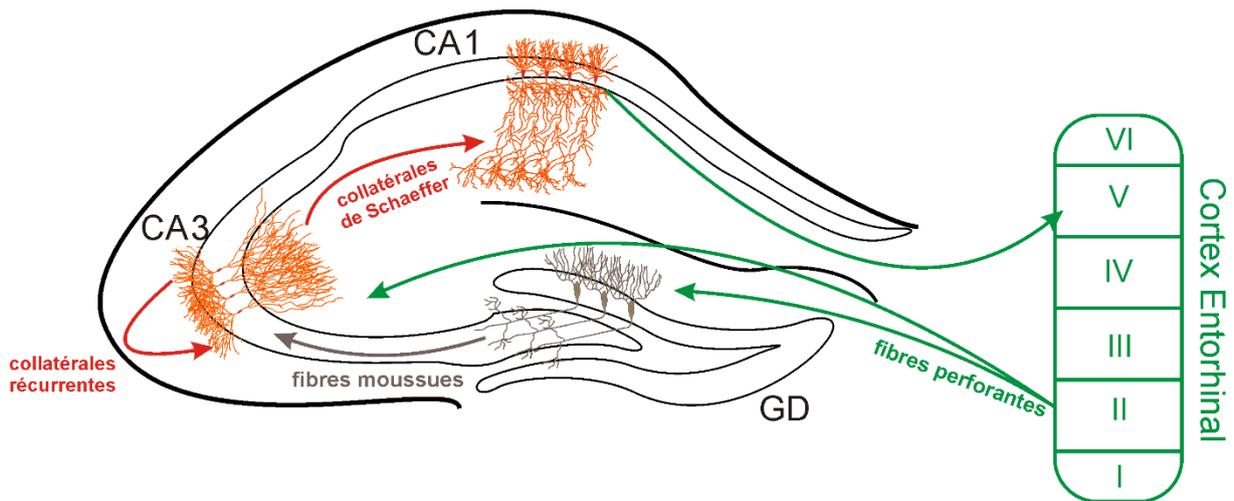


Figure 2 : Boucle synaptique de l'hippocampe.

Le signal provenant du cortex entorhinal (CE principalement de la couche II) est capté par les cellules granulaires du Gyrus Denté (GD) ou directement les cellules pyramidales de CA3 via les fibres perforantes, puis est transmis du GD à CA3 via les fibres dites moussues. Le signal est alors intégré par les collatérales récurrentes de CA3 pour ensuite gagner l'aire CA1 à travers les collatérales de Schaeffer. Les cellules pyramidales de CA1 vont alors projeter dans la couche profonde du subiculum et rejoindre la couche V du cortex entorhinal.

La région de CA1 est une des cibles principales des axones des cellules pyramidales de CA3 via les collatérales de Schaeffer. Les corps cellulaires des neurones de CA1 sont organisés en couche dense, et leurs dendrites apicales sont orientés de façon parallèle dans les *strata radiatum* et *lacunosum moleculare*, proches de la fissure hippocampique. L'axone émerge de la partie apicale du corps cellulaire et s'oriente vers l'alveus (**Figure 3**). Les cellules pyramidales de CA1 projettent principalement au niveau du subiculum et du cortex entorhinal, mais également vers d'autres structures corticales comme le septum latéral, le noyau accumbens ou le bulbe olfactif. La région CA1, avec le subiculum, peut donc être considérée comme la voie de sortie principale de l'hippocampe vers le cortex entorhinal et indirectement vers la plupart des aires corticales associatives.

Le corps cellulaire des cellules pyramidales de la région CA3 est plus volumineux que ceux des neurones de la région de CA1 (**Figure 3**). On distingue les régions CA3a, portion adjacente à CA2, de CA3b puis CA3c au niveau du hilus. Les dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 sont orientées radialement, se ramifient dans les *strata radiatum* et *lacunosum moleculare*, jusqu'à la fissure hippocampique pour les cellules des régions CA3a et CA3b ou la limite du *hilus* pour celles de la région CA3c (Ramon Y Cajal, 1911). Leur arborisation axonale est extensive. On estime qu'une cellule pyramidale de CA3 pourrait contacter entre 30

000 et 60 000 cellules cibles dans l'hippocampe, par des synapses qui sont rarement multiples (Sik, Tamamaki et al. 1993, Li, Somogyi et al. 1994).

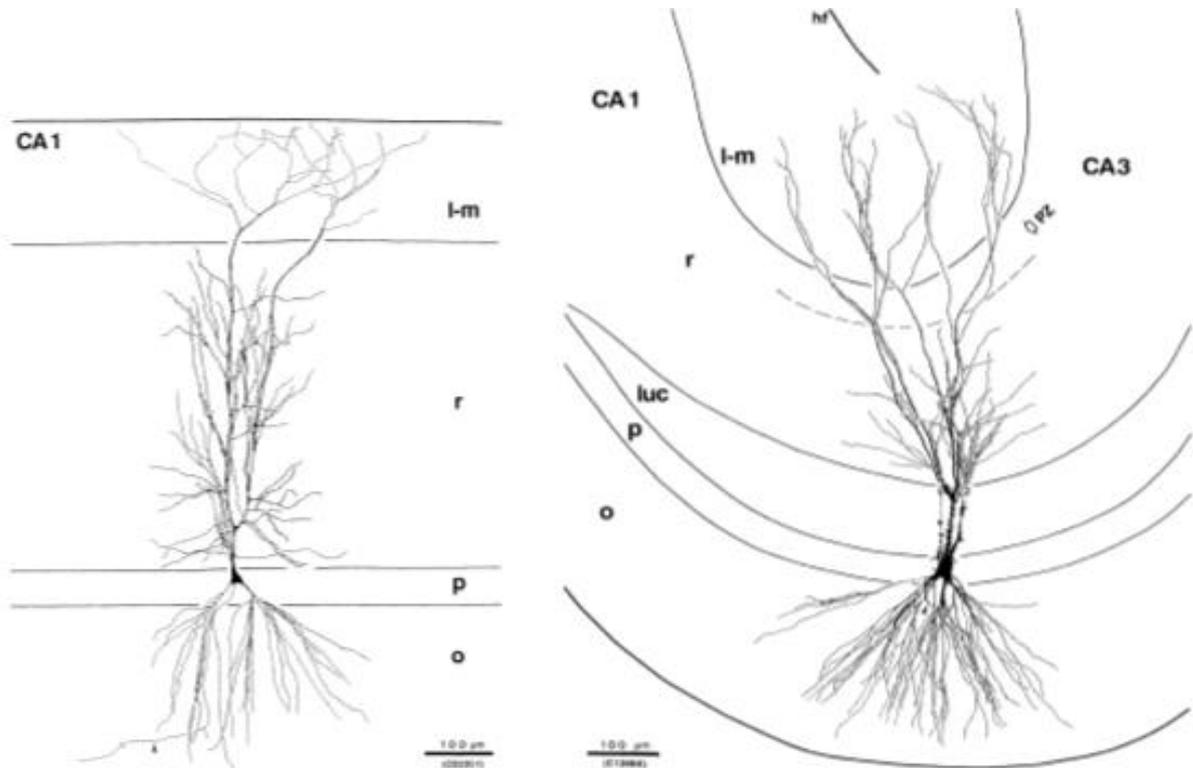


Figure 3 : Cellule pyramidale de CA1 et de CA3

A gauche : pyramide de CA1. Notez que les branches latérales des dendrites proximales s'étendent dans tout le *stratum radiatum* et forment des courbes et des trajectoires irrégulières dans le *lacunosum-moleculare*. L'axone est désigné par une flèche dans la *stratum oriens*. **A droite :** pyramide de CA3a. Pratiquement toutes les branches latérales des dendrites proximales sont situées dans les parties les plus profondes du *stratum radiatum* et il y a peu de ces branches dans la zone de projection (PZ). Les ramifications de l'arborisation dendritique recommence dans le *lacunosum moleculare*. De plus, on observe un grand nombre d'excroissances épineuses sur la partie proximale des dendrites apicales de ce neurone dans la *stratum lucidum*. L'axone de ce neurone est marqué avec une flèche dans la *stratum oriens*.

o = stratum oriens ; p = stratum pyramidale ; r = stratum radiatum ; l-m = lacunosum moleculare ; luc = stratum lucidum ; hf = fissure hippocampique

Tiré de Ishizuka et al 1995

Une des particularités des cellules pyramidales de CA3, par rapport aux autres aires de l'hippocampe, est d'être en partie connectées les unes aux autres via des collatérales excitatrices récurrentes. Ainsi, chaque pyramide de CA3 est connectée directement avec environ 2% des autres pyramides de CA3 (Miles and Wong 1983). De plus, les deux régions de CA3 (une dans chaque hémisphère) sont également interconnectées via les fibres commissurales de la fimbria. Cette différence de connectivité entre CA3 et CA1 laisse penser que ces deux régions ont des

caractéristiques fonctionnelles différentes. Comme nous l'avons vu plus haut, l'activation simultanée de neurones interconnectés est indispensable à la création d'assemblées cellulaires qui constituent le substrat physiologique des représentations mentales et de la mémoire associative (Harris, Csicsvari et al. 2003, Klausberger and Somogyi 2008, Lansner 2009). La structure anatomique de la région CA3, avec ses connexions collatérales récurrentes excitatrices, répond donc aux conditions de base de la théorie hebbienne (Marr 1971, Nakazawa, Quirk et al. 2002). Cependant, la contrepartie de cette connectivité récurrente excitatrice est la tendance naturelle à l'hypersynchronie dont la conséquence clinique est la crise d'épilepsie (Marr 1971, Cossart, Bernard et al. 2005). Ce système nécessite donc une inhibition puissante qui est exercée par un deuxième type neuronal très hétérogène : les interneurones GABAergiques.

b- Différents types spécialisés d'interneurones inhibiteurs

Les interneurones exercent une neurotransmission inhibitrice via la libération de GABA (acide gamma-amino butyrique). Ils peuvent contacter différentes parties de la cellule pyramidale. Par exemple, certains vont innover préférentiellement les dendrites et d'autres le soma des pyramides, exerçant des actions post-synaptiques différentes, qui répondent à des spécificités fonctionnelles distinctes. De façon générale, l'étude des différentes sous-populations d'interneurones a été principalement réalisée dans l'aire CA1. Cependant, l'aire CA3 est très différente fonctionnellement comme nous avons pu le voir. On peut donc s'attendre à ce que les propriétés fonctionnelles des interneurones y soient également différentes, méritant d'être étudiées plus précisément. La classification des interneurones se fait selon plusieurs critères : la localisation de leur corps cellulaire, leurs zones de projection axonale et dendritique, et les différents peptides qu'ils expriment (**Figure 4**).

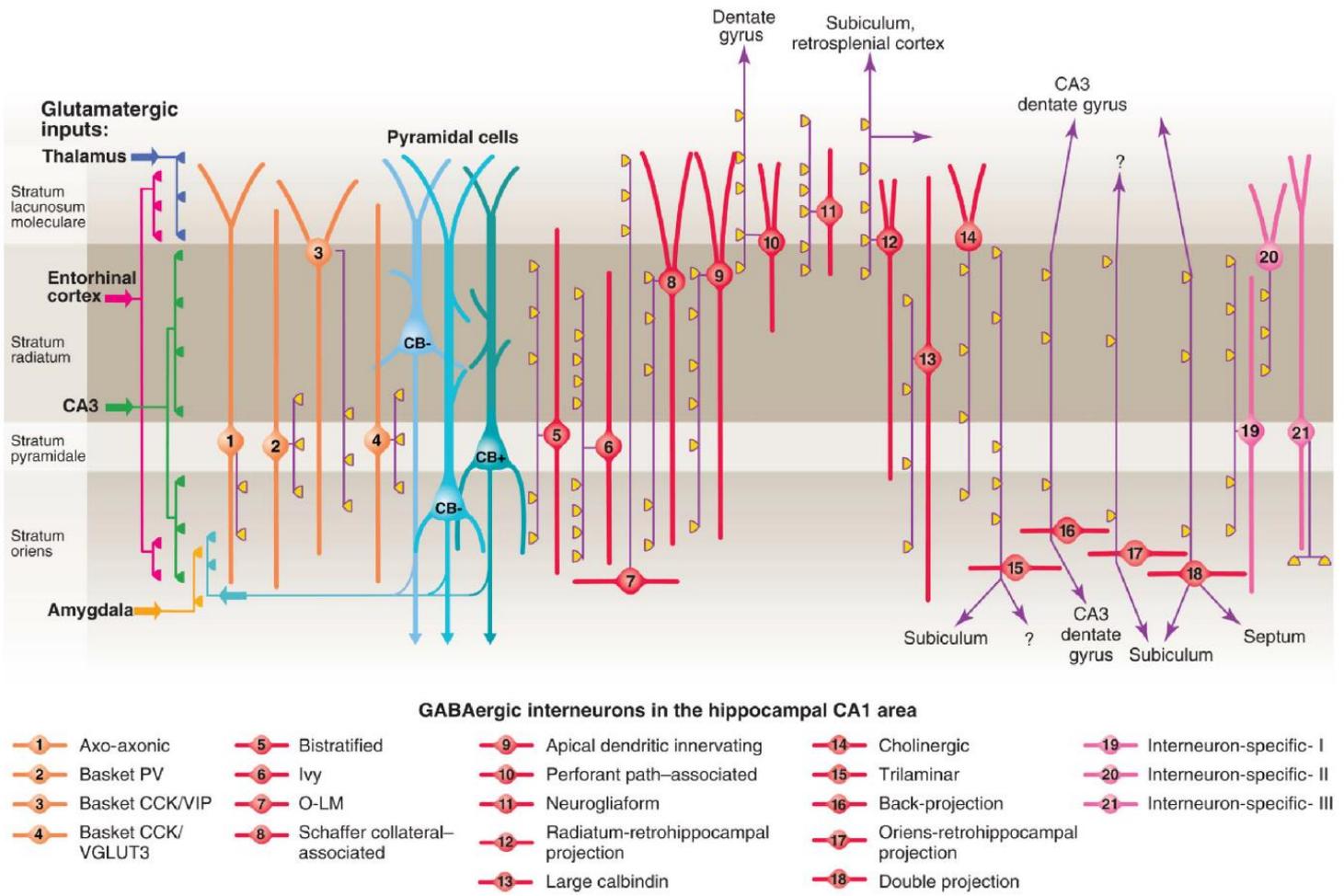


Figure 4 : Différents types d'interneurones de l'aire CA1 de l'hippocampe. Les cellules pyramidales sont en bleu. Les interneurones qui ciblent spécifiquement les cellules pyramidales sont en rouge et orange, et les interneurones qui ciblent d'autres interneurones sont en rose (à droite). Les axones sont en violet avec leurs terminaisons principales en jaune. CB : calbindin ; PV : parvalbumin, CCK : cholecystokinine, VGLUT : vesicular glutamate transporter, O-LM : oriens lacunosum-moleculare. Les afférences principales du cortex entorhinal, du thalamus, de l'amygdale et des cellules glutamatergiques de CA3 sont représentées à gauche. (Klausberger and Somogyi 2008)

i- Contrôle des inputs excitateurs et de leur intégration par l'inhibition dendritique

Les interneurones dits Oriens-Lacunosum Moleculare (« O-LM ») ont leur corps cellulaire dans le *stratum oriens* et une arborisation axonale dans le *stratum lacunosum moleculare* (Figure 4). Ils expriment fortement la somatostatine (SST) et dans une moindre mesure la parvalbumine (PV) (Freund and Buzsaki 1996, Bezaire and Soltesz 2013, Pelkey, Chittajallu et al. 2017). Dans CA1, les neurones O-LM sont principalement stimulés par les collatérales de Schaffer et

exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur les cellules pyramidales de CA1 au niveau de leurs dendrites apicales distales situées dans le *stratum lacunosum moleculare*.

Les interneurones en forme de lierre (Ivy cells) ciblent également principalement les dendrites des pyramides (dans le *stratum radiatum* et *oriens*), mais leur soma est localisé dans le *stratum pyramidale*. Ils expriment la nNos.

Les interneurones GABAergiques bistratifiés ont leur corps cellulaire localisé dans le *stratum pyramidale* et leurs dendrites s'étendent du *stratum oriens* au *stratum radiatum* (**Figure 4**). Ils projettent sur les dendrites des cellules pyramidales dans le *stratum oriens* et le *stratum radiatum*. Ils expriment principalement la PV mais aussi la SST et le neuropeptide Y (NPY) et déchargent de manière rapide et soutenue (« fast spiking »).

L'inhibition dendritique, du fait de la distance de leurs synapses avec le site d'initiation des potentiels d'action, influence peu le contrôle direct de la décharge des pyramides, par opposition à l'inhibition périsonomatique rapide et phasique. Par contre, elle est localisée de façon stratégique proche des épines et des synapses glutamatergiques, dont elle contrôle les courants et les interactions locales. Les courants inhibiteurs induits par les interneurones à innervation dendritique, enregistrés au niveau du soma, sont de faibles amplitudes et de cinétiques lentes (> 20 ms)(Maccaferri, Roberts et al. 2000, Szabadics, Tamas et al. 2007, Elfant, Pal et al. 2008), mais ils exercent un contrôle puissant du transfert entre soma et dendrites, où se trouvent les synapses excitatrices et la plasticité synaptique. La propagation rétrograde des potentiels d'action dans les dendrites, lorsqu'ils coïncident avec les input synaptiques, pourrait jouer un rôle crucial dans l'induction de la plasticité synaptique (Magee and Johnston 1997, Markram, Lubke et al. 1997, Paulsen and Moser 1998). Les interneurones qui ciblent les dendrites des cellules principales peuvent fournir un contrôle spatial de cette rétropropagation, et donc jouer un rôle important de contrôle de la plasticité synaptique (Buzsaki, Penttonen et al. 1996, Miles, Toth et al. 1996, Tsubokawa and Ross 1996).

i- Contrôle de la décharge neuronale par l'inhibition périsonomatique

Les interneurones GABAergiques de types panier et chandelier (basket et chandelier cells) ont leur soma dans ou à proximité de la couche pyramidale et projettent sur la région périsonomatique des cellules pyramidales par un axone fortement ramifié. Elles contactent une grande proportion des cellules dans leur champ de projection, et leurs synapses sont localisées de façon stratégique pour bloquer la décharge de leurs cellules cible. Certaines expriment la PV et d'autres la

Cholécystokinine (CCK) (Freund and Buzsaki 1996, Pelkey, Chittajallu et al. 2017). Les neurones GABAergiques en panier qui expriment la CCK présentent une adaptation de leur fréquence de décharge : leur fréquence de décharge est initialement élevée mais décroît rapidement lors d'une dépolarisation soutenue (Parra, Gulyas et al. 1998). Certains interneurons CCK coexpriment le VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) et d'autres les transporteurs vésiculaires du glutamate VGluT3 (**Figure 4**). Le soma des interneurons PV en panier est principalement localisé à la frontière entre le *stratum pyramidale* et le *stratum oriens*, et leurs dendrites s'étendent de l'alveus au *stratum lacunosum moleculare* (Freund and Buzsaki 1996, Pelkey, Chittajallu et al. 2017) (**Figure 4**). Ces neurones ont un mode de décharge à haute fréquence. Les interneurons en chandelier ou axo-axonique vont préférentiellement cibler le cône d'émergence de l'axone des cellules pyramidales (Freund and Buzsaki 1996, Pelkey, Chittajallu et al. 2017). Leur soma se situe principalement dans le *stratum pyramidale* et leurs dendrites s'étendent au niveau du *stratum lacunosum moleculare*. Leurs axones s'étendent principalement du *stratum oriens* mais aussi dans la couche profonde du *stratum pyramidale* (**Figure 4**). Ils reçoivent des afférences GABAergiques des neurones en panier et glutamatergiques des collatérales de Schaffer principalement dans CA1 (Halasy, Buhl et al. 1996). Au niveau électrophysiologique, les interneurons axo-axoniques déchargent de manière soutenue (ou « fast spiking ») et contrôlent efficacement l'émission des potentiels d'action des neurones pyramidaux (Glickfeld, Roberts et al. 2009).

La densité de projection axonale des interneurons PV périssomatiques en panier leur permettent d'exercer leur effet inhibiteur sur une large proportion de cellules pyramidales locales, et la grande efficacité de leur synapse aux sites multiples de libération contrôle efficacement la fenêtre d'excitabilité des pyramides (Pouille and Scanziani 2001, Buzsaki 2002, Csicsvari, Jamieson et al. 2003, Bartos, Vida et al. 2007). En moyenne, chaque interneurone PV en panier contrôle 1500-2000 cellules pyramidales, établissant 5 à 7 contacts synaptiques (Pelkey, Chittajallu et al. 2017). Par conséquent, il est généralement considéré que ce type d'interneurones via leurs propriétés anatomiques et fonctionnelles joue un rôle prépondérant dans le contrôle qualitatif de la décharge des cellules pyramidales (qui doit décharger et quand) et le maintien de l'homéostasie du circuit (maintien du réseau dans les limites physiologiques).

Les récepteurs glutamatergiques sont responsables de la majorité de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le système nerveux central des mammifères. Ils sont divisés en deux catégories : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques au glutamate.

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate en fonction de l'agoniste pharmacologique qui a permis de les mettre évidence la première fois : Les récepteurs NMDA (activés par le N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs AMPA (activés par l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et les récepteurs Kainate (KA), activés par l'acide kaïnique. Ce sont des hétéro ou homo-tétramère de sous-unités GluR1 à 4 chacun pouvant exister sous deux formes différentes alternatives. Ces récepteurs sont composés de quatre sous-unités délimitant un pore perméables aux cations sodium et potassium. Il existe une grande diversité de combinaisons possibles entre les différentes sous-unités ce qui entraîne une grande quantité d'isoformes et de récepteurs différents avec des propriétés fonctionnelles variées (Ozawa, Kamiya et al. 1998). Les récepteurs NMDA ont la particularité remarquable d'être perméables aux ions Ca^{2+} , ce qui n'est typiquement pas le cas des récepteurs AMPA/KA, à part ceux qui ne contiennent pas la sous-unité GRIA2, qui sont minoritaires. Ce sont majoritairement ces récepteurs qui permettent la dépolarisation de la membrane du neurone postsynaptique (PPSE ou potentiel post synaptique excitateur).

Les récepteurs NMDA sont des tétramères formés de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) responsable des caractéristiques fonctionnelle du récepteur. Les récepteurs NMDA sont bloqués au potentiel de repos par les ions magnésium qui occupent l'entrée du pore. Ce blocage par le magnésium est levé par la dépolarisation de la membrane. En plus du glutamate, l'activation de ce récepteur nécessite la présence de son co-agoniste, la glycine. L'entrée de calcium dans le neurone via ce récepteur permet l'induction de plasticité synaptique.

Les récepteurs Kainate quant à eux sont composés de cinq sous-unités de GluK1 à GluK5, sont répartis en post et en pré-synaptique et peuvent entraîner une réponse ionotropique rapide ainsi qu'une réponse métabotropique (Crepel and Mulle 2015).

Il existe huit membres différents de récepteurs métabotropiques au glutamate, qui sont par définition couplés aux protéines G (RCPG). Ils fonctionnent sous formes de dimères. Les récepteurs du groupe 1 (mGluR1 et 5) sont couplés à la protéine $G_{\alpha q}$; Ceux du groupe 2 (mGluR

2 et 3) et du groupe 3 (mGluR4,6,7,8) sont couplés à la protéine Gi/o. Ces récepteurs inhibent la libération de glutamate au niveau présynaptique et participent à la plasticité au niveau postsynaptique.

Comme nous l'avons vu l'apprentissage et la mémoire sont sous-tendus par des modifications de longue durée de la transmission synaptique par la potentialisation à long terme (LTP), dépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Malenka 1994). Celle-ci requiert la libération de glutamate (présynaptique) et la dépolarisation postsynaptique pour lever le blocage par les ions magnésium. Expérimentalement, l'induction de la LTP est typiquement réalisée par l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence (SHF), soit un ou plusieurs trains de stimulations dites téaniques (classiquement 100 Hz, pendant 1 seconde). Dans le protocole de SHF, le recrutement des interneurons chute rapidement, et l'activation des récepteurs AMPA crée une dépolarisation de la membrane post-synaptique qui lève le blocage du canal ionique des récepteurs NMDA par les ions magnésium. Une fois le canal ouvert, des ions calcium et sodium entrent dans la cellule alors que des ions potassium sortent. L'entrée d'ions calcium est un élément clé dans l'induction de la LTP. En effet, l'inhibition des variations de calcium intracellulaire, par l'utilisation de chélateurs des ions calcium, bloque l'induction de la LTP (Lynch, Larson et al. 1983). A l'inverse, l'augmentation de la concentration en calcium est capable d'induire une augmentation durable de la transmission synaptique (Malenka, Kauer et al. 1988). L'entrée importante de calcium, et ce de manière brève va notamment induire l'activation de la protéine kinase 2 dépendante du complexe calcium/calmoduline (CamKII) (Lisman, Schulman et al. 2002) qui va subir une autophosphorylation et enclencher une cascade de signalisation nécessaire à l'induction de la LTP.

L'expression de la LTP se caractérise par une augmentation durable de la transmission synaptique. Cette potentialisation est causée principalement par des changements postsynaptiques visant les récepteurs AMPA. Premièrement, la conductance des récepteurs AMPA est augmentée (Barria, Muller et al. 1997). Deuxièmement, le nombre de récepteurs AMPA synaptiques augmente via une modification du trafic des récepteurs suite à leur insertion à la membrane via un processus d'exocytose. C'est cette augmentation de la diffusion latérale des récepteurs AMPA qui est considérée comme le mécanisme majeur de l'expression de la LTP. Le maintien de la LTP pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, nécessite la synthèse de nouvelles protéines, y compris localement au niveau des dendrites, qui vont subir

des modifications morphologiques qui ont pour conséquences d'augmenter les courants synaptiques reçus (Yuste and Bonhoeffer 2001).

iii- Propriétés distinctes de la transmission excitatrice vers les interneurons et vers les cellules pyramidales

Les propriétés de la transmission excitatrice entre les pyramides et entre pyramides et interneurons sont très différentes. En effet, un PPSE évoqué dans les interneurons de CA1 est rapidement suivi d'une hyperpolarisation, limitant fortement la fenêtre d'opportunité pour une décharge post-synaptique. Le recrutement des interneurons est donc circonscrit aux quelques ms qui suivent l'input exciteur. A l'opposé, l'activation d'une cellule excitatrice tend à être suivie d'une dépolarisation plusieurs centaines de ms. Il en résulte une réponse évoquée (couplage EPSP-spike) beaucoup moins contrainte dans le temps (Fricker and Miles 2000).

Les interneurons expriment différents types de récepteurs ionotropiques du glutamate (Dingledine et al., 1999), qui peuvent être liés à des voies afférentes spécifiques (Tüth et Mcbain, 1998). Les récepteurs KA et NMDA ont des cinétiques plus lentes que les récepteurs AMPA: plusieurs dizaines de millisecondes pour les récepteurs KA, plusieurs centaines de millisecondes pour les récepteurs NMDA. Les propriétés dynamiques de la transmission synaptique glutamatergique excitatrice diffèrent selon les interneurons. Sur le plan fonctionnel, les cellules PV (périssomatiques) et SST (dendritiques) jouent des rôles complémentaires dans la régulation de l'excitabilité du réseau cortical. Ils sont recrutés de manière séquentielle pour produire un changement d'inhibition récurrente le long de l'axe somato-dendritique (Pouille and Scanziani 2004). Les interneurons PV sont recrutés de façon transitoire au début d'un train de décharge, et induisent une inhibition rapide, forte et décroissante tandis que les interneurons SST sont recrutés plus tard, et induisent une inhibition tardive mais croissante.

On distingue également l'inhibition récurrente (ou feed-back inhibition) et l'inhibition antérograde (ou feed-forward inhibition). L'inhibition récurrente est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui suite à leur activation va entraîner l'excitation des interneurons qui les contactent, ayant comme conséquence une inhibition en retour des neurones pyramidaux. Dans la région CA1 de l'hippocampe, cette feed-back inhibition implique plusieurs sous-types d'interneurons comme les neurones en panier exprimant la PV

ou la CCK et les interneurons chandeliers / axo-axoniques (Kullmann 2011) responsables de l'inhibition périsomatique des neurones pyramidaux (Glickfeld, Atallah et al. 2008). L'inhibition antérograde (ou feed-forward inhibition) est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui accompagne leur excitation mono-synaptique. Par exemple, les collatérales de Schaffer provenant de la région CA3 peuvent contacter à la fois un neurone pyramidal de la région CA1, créant dans un premier temps un PPSE dans le neurone cible, mais aussi un interneurone lui-même connecté au neurone cible créant un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI). Au début des années 2000, le groupe de Scanziani a émis l'hypothèse que cette inhibition feed-forward était responsable d'une amélioration de la précision temporelle de la décharge neuronale dans les neurones CA1 de l'hippocampe (Pouille and Scanziani 2001). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'après le blocage pharmacologique de la composante inhibitrice de la séquence PPSE-PPSI réalisée suite à la stimulation des collatérales de Schaffer, la fenêtre de temps avec laquelle un potentiel d'action peut être émis par le neurone pyramidal va être augmentée créant ainsi une diminution de la fidélité temporelle.

3- Fonctionnement et dynamiques du circuit hippocampique pour le codage et la mémoire

a- Alternance entre encodage et consolidation par deux configurations distinctes du circuit hippocampique.

Il a été proposé que la formation de la mémoire impliquerait deux états différents de l'hippocampe (Marr 1971, Buzsaki 1989, Buzsaki 2015). Durant la phase active ou d'encodage « online », les afférences vers la région CA3 seraient renforcées et plastiques alors que les synapses des collatérales récurrentes seraient déprimées, favorisant le contrôle par les afférences externes. L'information nouvellement acquise serait ainsi temporairement maintenue dans le circuit de CA3 (Buzsaki 1989). A l'opposé, durant les périodes de repos ou de consolidation « offline », les collatérales récurrentes seraient renforcées et les afférences externes déprimées. Les assemblées cellulaires de CA3 seraient ainsi libres d'être réactivées sous forme de bouffées d'activité synchrone (initiées par les collatérales récurrente du réseau), permettant le transfert coopératif de l'activité vers la région CA1 et leur transfert vers les régions cibles de l'hippocampe, ce qui permettrait de convertir la trace mnésique temporaire en une forme de mémoire à plus long terme (Buzsaki 1989, Buzsaki 2015).

L'acétylcholine joue un rôle central dans la modulation de l'activité de l'hippocampe, et en particulier de la région CA3. La plupart des afférences cholinergique de l'hippocampe proviennent du complexe du septum médian et de la bande diagonal de Broca (Hasselmo 2006, Hasselmo and Giocomo 2006) qui exercent leur rôle modulateur via des récepteurs muscariniques (Yamasaki, Matsui et al. 2010, Dasari and Gullledge 2011) et nicotiniques (Alkondon and Albuquerque 2001). Des études chez l'humain ont montré qu'un blocage de ces récepteurs muscariniques par l'injection systémique de scopolamine interférait avec l'encodage de nouvelles information verbales (Hasselmo and Wyble 1997). Durant la phase active d'encodage, l'acétylcholine dépolarise les cellules pyramidales et réduit l'accommodation de leur décharge leur permettant de répondre plus efficacement aux afférences externes (Hasselmo and McGaughy 2004). L'application d'agoniste cholinergique renforce la LTP dans de nombreuses afférences synaptiques majeures telles que la voie perforante, le gyrus denté ou les collatérales de Schaffer (Blitzer, Gil et al. 1990). De plus, la scopolamine (antagoniste cholinergique) bloque le renforcement de la LTP par l'acétylcholine et entraine des dysfonctions mnésiques et en particulier durant l'encodage (Burgard and Sarvey 1990, Huerta and Lisman 1993). Durant les phases d'immobilité ou de sommeil, en l'absence d'afférences sensoriels, l'activité désynchronisée de l'hippocampe permettrait la réactivation de la trace mnésique. Durant cette phase les faibles niveaux d'acétylcholine permettent d'augmenter la neurotransmission glutamatergique des collatérales de CA3 entraînant une boucle d'excitation récurrente propice à cette réactivation (Rovira, Cherubini et al. 1982, Hasselmo and Schnell 1994). Ainsi, l'efficacité accrue des connexions excitatrices collatérales permet la réactivation des traces mnésiques (assemblées) formées pendant l'encodage. Leur réactivation favorise la LTP aux synapses suivantes de CA3 à CA1 et de CA1 au CE (**Figure 5**).

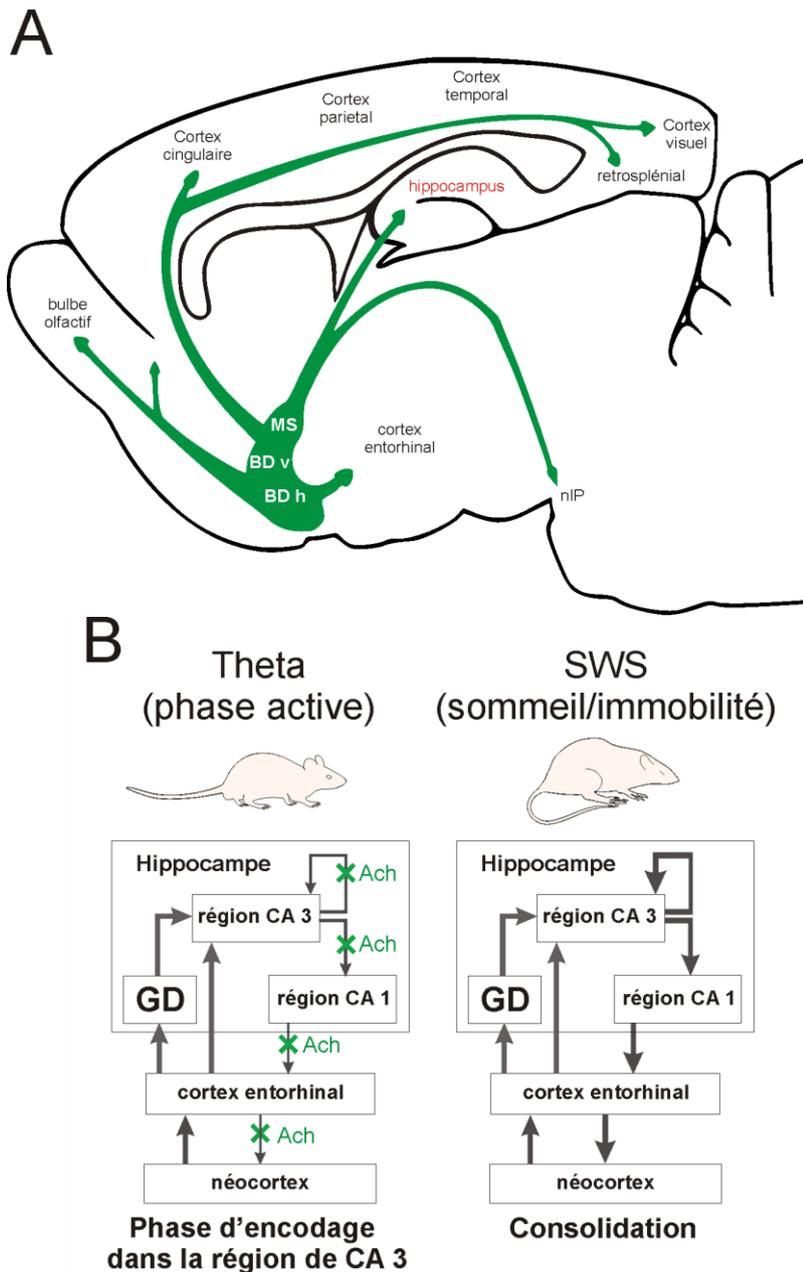


Figure 5 : Rôle de l'acétylcholine dans le contrôle de la dynamique de l'hippocampe. (A) Représentation du réseau cholinergique du cerveau de souris (MS =médial septum ; BD v = Partie ventral de la bande diagonal de Broca ; BDh = Partie horizontale de la bande diagonal de Broca ; nIP = noyau interpendunculaire). (B) Schéma de la modulation cholinergique de la dynamique de l'hippocampe pendant l'encodage (« online ») et la consolidation (« offline »). A gauche, pendant le réveil actif, des niveaux élevés d'acétylcholine adaptent la dynamique de l'hippocampe pour l'encodage. Les informations sensorielles en provenance du néocortex traversent le cortex entorhinal et le gyrus denté pour gagner CA3, où les modifications synaptiques aident à formation d'une représentation intermédiaire des différents éléments d'une mémoire épisodique. Les hauts niveaux d'acétylcholine empêchent le transfert de cette information vers CA1, le cortex entorhinal et les autres aires associatives du néocortex. A droite, durant les phases immobile ou durant le sommeil les faibles niveaux d'acétylcholine libèrent le retour les inputs excitateurs de CA3. Cette forte rétroaction excitatrice favorise la réactivation de mémoires stockées dans la région CA3 et leur transfert vers CA1 via les collatérales de Schaeffer CA1 puis au cortex entorhinal et enfin aux autres aire associative pour un stockage à long terme. Adapté de Hasselmo et al 2004

La synchronisation de populations neuronales et la précision spatio-temporelle des interactions entre les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales est coordonnée au sein de rythmes cérébraux qui peuvent être observés par des enregistrements extracellulaires ou par un électroencéphalogramme (EEG). Par convention, les oscillations neuronales sont nommées en fonction de leur bande de fréquences : les oscillations Thêta (4 – 12 Hz), Gamma (30 – 90 Hz), delta (0.1 – 3 Hz) et « Ripples » (200 Hz), associées à des états distincts du réseau hippocampique. Les mécanismes de génération de ces activités rythmiques ne sont pas totalement élucidés, mais on sait qu'ils résident dans les interactions entre cellules pyramidales et divers types d'interneurones.

La coordination entre pyramides et divers types d'interneurones au sein des rythmes peut être décrite en termes de phase préférentielle de décharge. Au sein du rythme thêta, les interneurones montrent différentes préférences de phase en fonction de leur type, ce qui constitue d'ailleurs un critère d'identification de cette population neuronale très hétérogène (Csicsvari, Hirase et al. 1999, Klausberger, Magill et al. 2003) (**Figure 6**). Les interneurones en chandelier déchargent juste après le pic de thêta et les CCK déchargent un peu avant. Les OLM et les interneurones bistratifiés sont actifs dans le creux de thêta (Pelkey, Chittajallu et al. 2017). Enfin, les interneurones PV en panier déchargent jusqu'à une fréquence de 18 ± 12 Hz pendant le rythme thêta, préférentiellement dans sa phase descendante (Lee, Marchionni et al. 2014, Forro, Valenti et al. 2015).

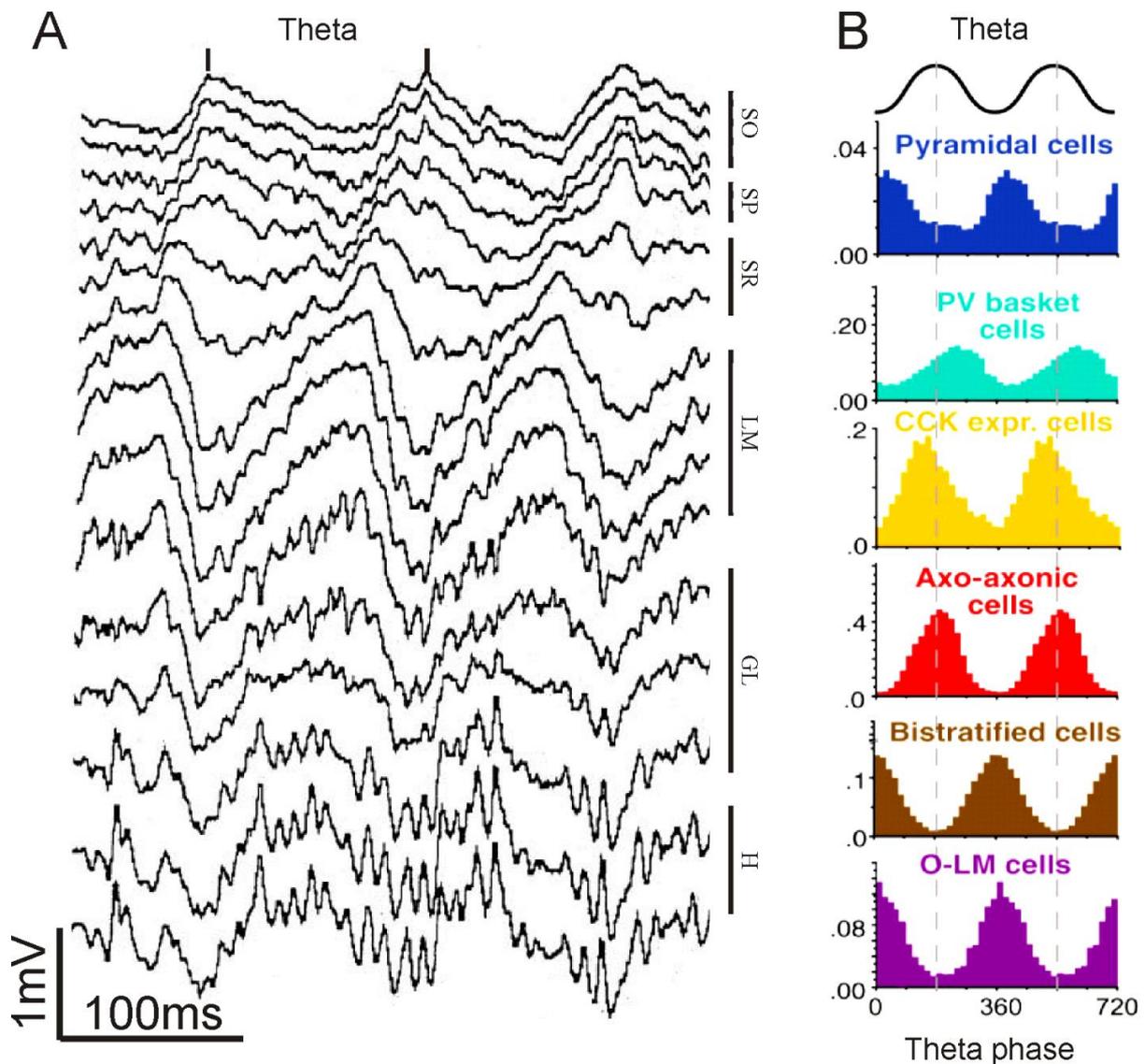


Figure6 : Le rythme thêta hippocampique :

(A) Enregistrement électrophysiologique de l'hippocampe de rat anesthésié à l'uréthane. Les électrodes sont positionnées de façon à enregistrer le profil laminaire du rythme thêta selon l'axe CA1–GD. SO = stratum oriens ; SP = Stratum pyramidale ; SR = stratum radiatum ; LM = lacunosum moleculare ; GL = granular layer ; H = hilus. Les oscillations thêta sont enregistrées durant l'exploration. A noter le shift graduel de la phase de thêta de SO à LM (Bragin, Jando et al. 1995). (B) Phases préférentielles de décharge des cellules de l'hippocampe durant les différentes phase du rythme thêta. (Adapté de Klausberger and somogyi 2008)

Les différentes catégories d'interneurones se comportent différemment pendant le delta. Durant le delta on observe de larges déflexions négatives transitoires des potentiels de champs du radiatum appelés Sharp Waves, provenant de l'excitation massive des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de Schaffer au niveau du *stratum radiatum* lors de l'activation synchrone des cellules pyramidales de CA3 (Csicsvari, Hirase et al. 2000). Dans la couche pyramidale de CA1, l'excitation massive des pyramides entraîne une interaction particulière avec les interneurones (Buzsaki and Chrobak 1995, Ylinen, Bragin et al. 1995, English, Peyrache et al. 2014). En lien avec cette observation, il a été émis l'hypothèse que l'excitation massive en provenance de CA3 excite les interneurones de CA1 qui, par leurs propriétés intrinsèques et leur connectivité, permettent à la population neuronale de décharger à la fréquence des ripples en contrôlant temporellement l'activité des cellules pyramidales (Stark, Roux et al. 2014). Les interneurones les plus aptes à exercer ce contrôle durant les Sharp Waves ripples (SWPR) sont les interneurones PV en panier qui augmentent leur fréquence de décharge de 90 à 200 Hz (proche de la fréquence des ripples) (Lee, Marchionni et al. 2014, Forro, Valenti et al. 2015) et qui exercent une inhibition puissante et rapide (Gan, Weng et al. 2017). Durant les SPWRs certains interneurones augmentent leur activité, d'autres ne modulent pas ou encore diminuent leur activité (**Figure 7**) (Freund and Buzsaki 1996). Les interneurones bistratifiés et en panier déchargent dans les phases ascendantes de l'oscillation, alors que les interneurones exprimant la CCK, les O-LM ainsi que les axo-axoniques sont silencieux durant les SPWRs (Csicsvari, Hirase et al. 1999, Klausberger, Marton et al. 2004).

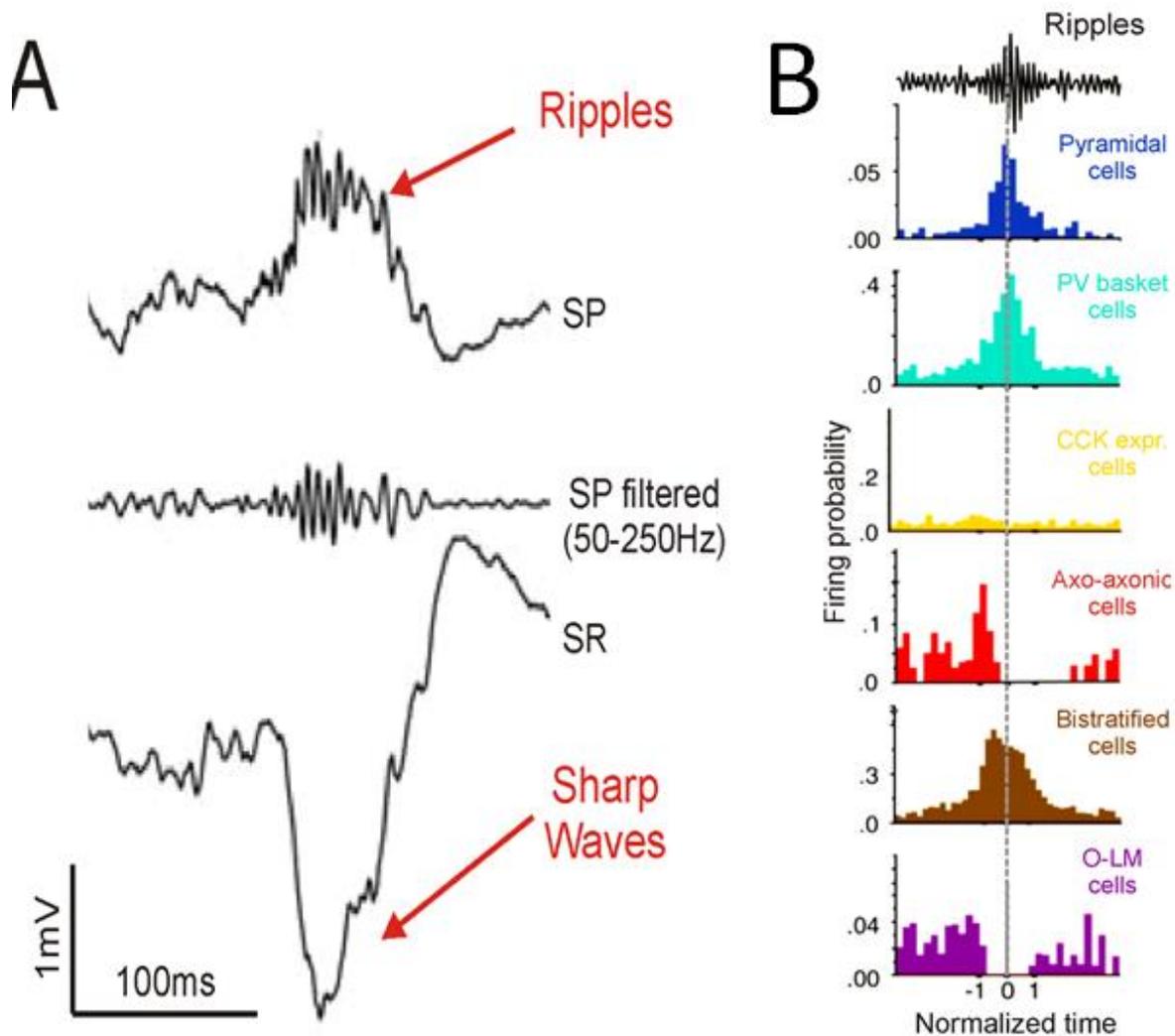


Figure 7 : Les Sharp Waves ripples dans le circuit hippocampique.

(A) Enregistrement électrophysiologique simultanée dans la couche pyramidale de CA1 et le milieu de la stratum radiatum. Egalement, la même trace de l'enregistrement de la couche pyramidale filtré (50-250HZ). Ici est illustrée une ripple isolée dans la couche pyramidale et la sharp wave correspondante dans la stratum radiatum. (B) Phases préférentielles de décharge des cellules de l'hippocampe durant les ripples de CA1 (Adapté de Klausberger and somogyi 2008)

Plusieurs fonctions ont été attribuées à ces différents rythmes. Une hypothèse intéressante décrit les rythmes comme une référence temporelle permettant de distinguer les assemblées neuronales activées au cours de l'encodage. Lorsque l'animal traverse le champ d'activité d'une cellule de lieu, la décharge de celle-ci se produit de plus en plus tôt à chaque cycle thêta, un phénomène appelé la précession de phase (O'Keefe and Recce 1993). Or, comme chaque cycle thêta est accompagné de la décharge de plusieurs cellules de lieu associées à des champs d'activité séquentiels en recouvrement partiel (trajectoire de l'animal), un cycle thêta individuel contiendrait ainsi une représentation compressée de l'espace (Skaggs, McNaughton et al. 1996) (**Figure 8**). Ainsi, la précession de phase permettrait de coder à la fois de la position présente de l'animal (cellule la plus active), la trajectoire passée (cellules déchargeant plus tôt dans le cycle) et la trajectoire future (cellules déchargeant plus tard dans le cycle (Dragoi and Buzsaki 2006, Huxter, Senior et al. 2008)). Des expériences ont par ailleurs montré que l'inhibition périsomatique et l'inhibition dendritique ont des rôles distincts dans la décharge des cellules de lieu lors d'une tâche d'exploration. En effet, la perturbation des neurones qui expriment la SST augmente le taux de décharge des cellules de lieux mais n'altère pas leur probabilité de décharge dans la phase du cycle Thêta. Alors que la perturbation des neurones qui expriment la PV n'affecte pas le taux de décharge des cellules de lieu mais provoque un décalage de leur activité dans la phase du Thêta (du pic vers le creux du Thêta) (Royer, Zemelman et al. 2012).

Les séquences de cellules de lieu peuvent être aussi compressées pendant les ripples à une échelle de temps qui favoriserait la plasticité synaptique et la coopération pour activer les cibles postsynaptiques au niveau du néocortex et y transférer l'information mnésique pour un stockage à long terme (Buzsaki 2015). Les SWRs se produisent pendant les périodes d'immobilité de l'animal (lorsque les *stimuli* environnementaux exercent une action mimine sur l'hippocampe) et le fait de rejouer les séquences de cellules de lieu pendant les SWRs (« replay ») servirait à consolider la représentation d'une carte cognitive de l'environnement (Buzsaki 1989, Buzsaki 2015) (**Figure 8**). La perturbation des SWRs par une approche d'optogénétique, provoque des erreurs de codage des cellules de lieu dans un environnement donné mettant en évidence que la réactivation des séquences de cellules de lieu pendant les SWRs sont nécessaires pour stabiliser et définir les champs d'activité des cellules de lieu, et donc maintenir une carte cognitive stable (Roux, Hu et al. 2017). Leur interruption suite à l'exploration d'un environnement en retarde également l'apprentissage (Girardeau, Benchenane et al. 2009).

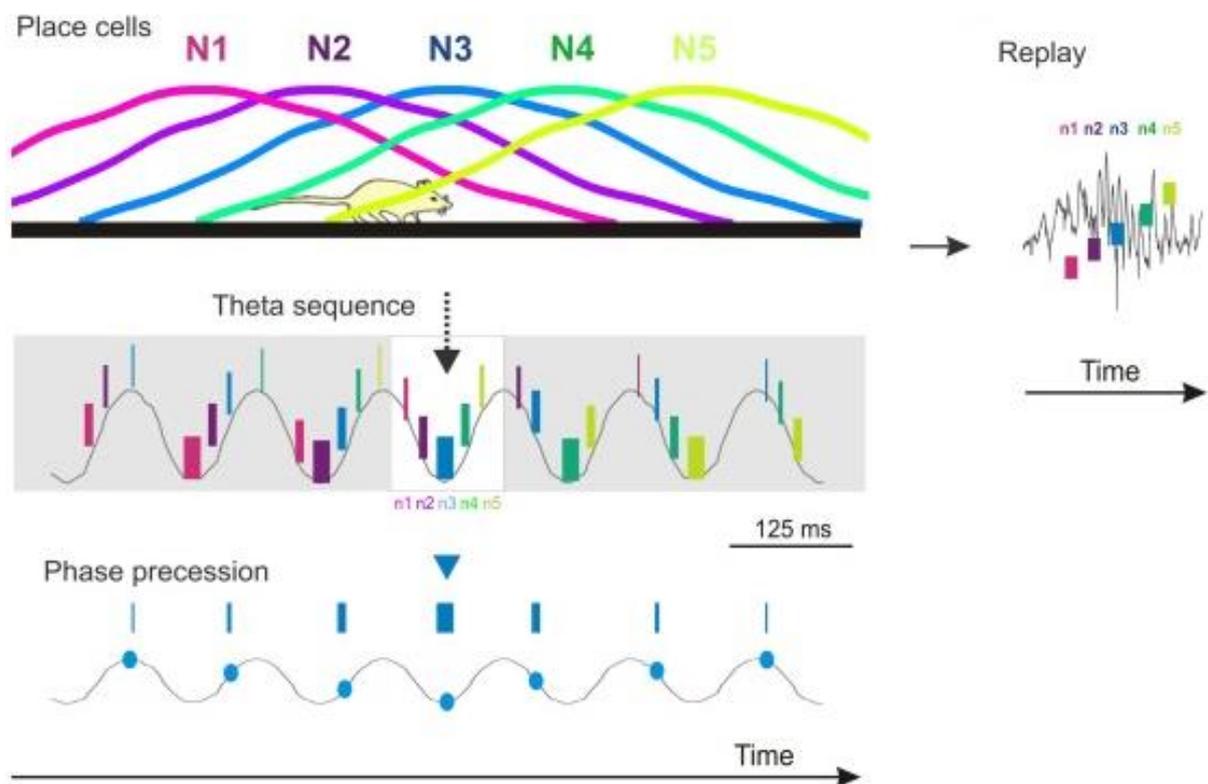


Figure 8 : La précession de phase

la séquence cellulaire des cinq neurones (N1 – N5) qui déchargent dans le même ordre dans l'espace suivant leur champ d'activité. En dessous, la décharge synchroniser de ces 5 neurones en fonction du rythme thêta en ligne grise au cours de l'exécution. Les neurones sont codés par couleur; L'épaisseur des barres verticales indique le taux de décharge, le plus élevé étant au creux de thêta. En bas, phase de précession de la cellule de lieux N3. A gauche, la séquence de cellules de lieu (N1 à N5) est rejouer pendant le sommeil ou l'immobilité durant les ripples. Tiré de Dragoi et al 2013

Les oscillations gamma ont également un rôle important dans le codage et la mémoire. Ces oscillations permettraient notamment de séparer les décharges des différentes assemblées cellulaires qui sont actives au sein du même cycle de thêta (Jensen and Colgin 2007, Senior, Huxter et al. 2008). Généralement les oscillations thêta et gamma ont lieu de manière coordonnée et l'amplitude de l'oscillation gamma est modulée par la phase de l'oscillation thêta (Bragin, Jando et al. 1995, Chrobak and Buzsaki 1998). Chaque cycle gamma correspondrait potentiellement à l'arrivée synchronisée des entrées en provenance d'une assemblée neuronale particulière. La genèse de ce rythme dans l'hippocampe dépendrait étroitement de l'inhibition feedback exercée par les interneurons PV (Tukker, Fuentealba et al. 2007, Buzsaki and Wang 2012). En effet, l'activation artificielle des interneurons PV par manipulation optogénétique permet de générer expérimentalement ce type d'oscillations (Cardin, Carlen et al. 2009). De plus, l'application d'agoniste des récepteurs opioïdes (DAMGO) qui inhibe l'activité des

interneurones en basket mais pas des axo-axoniques élimine les oscillations gamma *in vitro* et *in vivo* (Gulyas, Szabo et al. 2010).

L'activité GABAergique du réseau est donc essentielle dans le circuit de l'hippocampe. Le premier rôle que l'on attribue traditionnellement aux interneurones est qu'ils maintiennent le réseau dans les limites physiologiques en limitant l'emballement du système en particulier dans une région hyper-connectée comme CA3, mais comme nous venons de le voir ils permettent de séquencer/synchroniser les décharges des cellules pyramidales dans un ensemble cohérent pour l'émergence d'assemblées cellulaires à la base des processus de mémorisation.

B- Transmission GABAergique et régulation du chlore dans les conditions physiologiques

1- Complexité de la transmission GABAergique

Les récepteurs au GABA sont responsables de la majorité de la neurotransmission inhibitrice dans le système nerveux central des mammifères adultes. On différencie les récepteurs ionotropiques, GABA-A et les récepteurs métabotropiques GABA-B.

a- Les récepteurs métabotropiques GABA-B

Les récepteurs GABA-B sont couplés aux protéines G et influencent la transmission synaptique dans une échelle de temps lente (de la milliseconde à la minute). Ils activent les protéines de type G α i/o inhibant l'adénylate cyclase et de type G β γ qui se lient aux canaux ioniques. Ces récepteurs sont constitués de différentes sous-unités (GABAB1a, GABAB1b et GABAB2, (Kaupmann, Huggel et al. 1997), assemblées en hétérodimères qui requièrent l'association de deux sous-unités homologues, GABAB1 et GABAB2. La sous-unité GABAB1 lie le GABA, tandis que la sous-unité GABAB2 est nécessaire à l'activation des protéines G. Chaque sous-unité est constituée d'un domaine transmembranaire à 7 hélices, et d'un grand domaine extracellulaire sur lequel se situe le site de liaison du GABA dans la sous-unité GABAB1. Les souris déficientes en sous-unités GABAB1 ou GABAB2 sont viables mais présentent des crises épileptiques spontanées, une hyperalgésie, une hyper locomotion et une détérioration de la mémoire (Schuler, Luscher et al. 2001, Gassmann, Shaban et al. 2004). Ces récepteurs GABA-B peuvent être pré ou post-synaptique.

Les récepteurs GABA-B pré-synaptiques sont présents aux terminaisons inhibitrices où ils fonctionnent comme des autorécepteurs. Ils activent la protéine $G\beta\gamma$ qui inhibe l'influx calcique dans les terminaux présynaptiques excitateurs inhibant le déclenchement de la libération de neurotransmetteurs en ciblant la machinerie de libération vésiculaire en interagissant avec les protéines responsables de la fusion vésiculaire (les SNAREs) (Poncer, McKinney et al. 1997). De plus, l'activation de la protéine $G\alpha/o$ peut aussi inhiber la fusion vésiculaire pour réduire la libération spontanée et par conséquent la fréquence des courants post synaptiques (Rost, Nicholson et al. 2011).

Les récepteurs GABA-B postsynaptiques exercent leur action inhibitrice post-synaptique via l'activation de la protéine $G\beta\gamma$ qui active les GIRK. Les GIRK sont des canaux potassiques également couplés aux protéines G à rectification entrante provoquant une sortie d'ion potassium entraînant une hyperpolarisation du neurone post-synaptique (Kulik, Vida et al. 2006). Les récepteurs GABA-B réduisent également l'excitabilité neuronale par l'activation des canaux potassiques TREK2 permettant également une sortie de potassium (Deng, Xiao et al. 2009).

Les récepteurs GABA-B pré- et postsynaptiques sont connus pour réguler l'expression de la potentialisation à long terme (LTP) en réduisant directement ou indirectement l'excitabilité du neurone postsynaptique, ce qui influence l'activité des récepteurs NMDA et l'induction de la LTP (Davies, Starkey et al. 1991). De plus, il a été proposé que les récepteurs GABA-B postsynaptiques peuvent moduler les processus de LTP en inhibant directement la perméabilité aux ions calcium des récepteurs NMDA par une voie de signalisation de la PKA (Chalifoux and Carter 2011). Il est de plus en plus reconnu que ces récepteurs ont un rôle important dans le contrôle de l'activité de réseau spontanée ce qui est fondamental pour les processus cognitifs. Durant une activité de réseau synchronisée, les populations de neurones oscillent entre états actifs et états de repos. Les récepteurs GABA-B sont activés pendant les états actifs, lorsque les interneurones déchargent de manière synchrone, et contribuent à y mettre fin. Le contrôle des oscillations du réseau implique les récepteurs GABA-B postsynaptiques (de la Prida, Huberfeld et al. 2006). Dans des conditions physiologiques, les récepteurs GABA-B peuvent seulement être recrutés durant une activité synchrone des interneurones, comme cela se produit par exemple durant un rythme θ . Il a été montré que l'activation de ces récepteurs ont un rôle dans l'activité rythmique dans l'hippocampe en contrôlant la fréquence d'oscillations (Scanziani 2000).

b- Les récepteurs ionotropiques GABA-A, perméables au chlore

Les récepteurs GABA-A sont des pentamères hétéromériques, formés de différentes sous-unités: $\alpha 1$ – $\alpha 6$; $\beta 1$ – $\beta 3$, $\gamma 1$ – $\gamma 3$, $\rho 1$ – $\rho 3$; ϵ , δ , θ et π , qui sont codées par 19 gènes chez l’homme (Miller and Aricescu 2014). Cette hétérogénéité moléculaire explique la diversité fonctionnelle de ces récepteurs qu’ils soient synaptiques ou extra synaptiques. La forme la plus fréquente chez l’adulte est constituée des sous unités transmembranaires arrangées comme suit $\gamma 2 : \beta 2 : \alpha 1 : \beta 2 : \alpha 1$ formant un pore central perméable aux ions chlores et bicarbonates (**Figure 9**). Le domaine extracellulaire des récepteurs GABA-A comprend deux sites de liaison au GABA situés aux interfaces entre les sous-unités α et β . L’activation du canal chlore peut avoir lieu lorsque un de ces deux sites est occupé mais elle est favorisée d’environ 60 fois lorsque les deux sites sont occupés sachant que le deuxième a une affinité trois fois plus forte (Baumann, Baur et al. 2003). Il existe des modulateurs capables de contrôler l’ouverture du canal tels que les barbituriques ou les benzodiazépines. De façon intéressante, des études récentes suggèrent que les potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSIs) générés dans les cellules pyramidales de CA1 par les interneurons en panier et bistratifiés présentent des réponses pharmacologiques différentes aux benzodiazépines. En effet, le diazépam a peu d’effet sur les PPSIs médiés par les cellules en panier mais module fortement la cinétique de ceux en provenance des interneurons bistratifiés et axo-axoniques (augmentation de 30 à 100% de l’halfwidth des PPSIs) (Pawelzik, Bannister et al. 1999). En revanche, le zolpidem augmente l’amplitude des PPSIs en provenance des cellules en panier et axo-axoniques mais n’affecte pas l’amplitude des PPSIs en provenance des interneurons bistratifiés (Thomson, Bannister et al. 2000). Ces résultats suggèrent que les PPSIs en provenance de différents types interneurons pourraient être médiés par différents récepteurs ou combinaisons de récepteurs GABA-A. L’utilisation de ces différents agents permet donc de différencier l’origine des PPSIs dans la cellules post-synaptique (interneurone bistratifié, axo-axonique ou en panier).

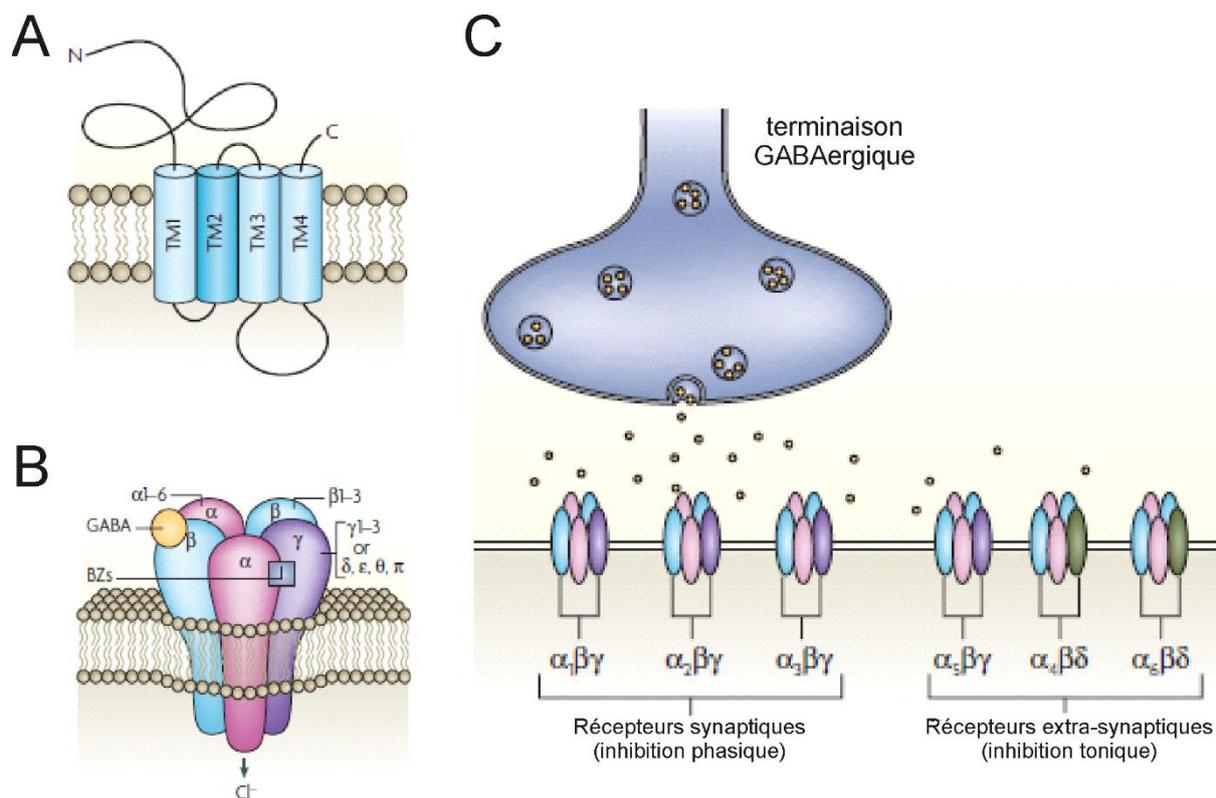


Figure 9 : Structure et localisation des récepteurs ionotropiques au GABA.

(A) Structure d'une sous-unité des récepteurs GABA-A. (B) Organisation d'un récepteur GABA-A avec les différents sites de fixation du GABA et aux benzodiazépines (BZs). (C) Les récepteurs GABA-A composés des sous-unités $\alpha_{1-3}\beta$ sont au niveau post synaptique tandis que les récepteurs composés des sous-unités $\alpha_{4/6}\beta\delta$ ou $\alpha_5\beta\gamma$ sont préférentiellement extra-synaptiques (Jacob et al, 2008)

On distingue deux composantes dans l'inhibition GABAergique médiée par les récepteurs GABA-A. La fixation du neurotransmetteur GABA sur son récepteur entraîne l'ouverture du canal qui laisse passer les ions Cl^- . La forte concentration de cet ion dans le milieu extracellulaire entraîne sa fuite par le canal GABA-A vers le milieu intracellulaire engageant une hyperpolarisation et donc l'inhibition du neurone post-synaptique (PPSI). De plus, l'ouverture des canaux Cl^- diminue la résistance membranaire du neurone et donc l'amplitude des réponses synaptiques excitatrices, c'est l'effet shunt (Higley 2014). Toute variation du nombre, de la composition, ou de l'état des récepteurs GABA-A postsynaptiques ainsi que la quantité de GABA libérée par les neurones pré-synaptiques sont susceptibles de modifier la réponse postsynaptique inhibitrice.

L'inhibition GABAergique qui régule précisément l'activité des neurones post-synaptiques est une inhibition dite phasique. A l'inverse, il existe une inhibition GABAergique dite tonique qui

est exercée sur des récepteurs extra-synaptiques (contenant les sous unités δ) qui permet également de réduire l'excitabilité des neurones (Semyanov, Walker et al. 2004).

La transmission inhibitrice GABAergique via les récepteurs GABA-A est donc complexe, mélangeant l'effet shunt et l'hyperpolarisation des cellules post-synaptiques et dépend grandement du gradient chlore via la différence des concentrations intracellulaires et extracellulaires de cet ion. Des variations de ces concentrations peuvent entraîner des modifications significatives de l'efficacité voire même de la polarité des réponses de cette transmission (inhibition versus excitation de la cellule post-synaptique). La régulation de l'homéostasie de chlore est donc primordiale dans le maintien d'une inhibition fonctionnelle au sein du système nerveux.

2- Les principaux acteurs de l'homéostasie du Chlore

Cette homéostasie dépend de trois modes de passage d'un ion à travers la membrane plasmique : Le transport passif qui ne consomme pas d'énergie et se fait dans le sens du gradient électrochimique de l'ion à travers la membrane. Le transport actif primaire qui consomme de l'énergie fournie par l'ATP pour déplacer l'ion contre son gradient électrochimique. Le transport actif secondaire qui utilise l'énergie fournie par la dissipation des gradients chimiques établis par le transport actif primaire pour déplacer un ion contre son gradient électro-chimique. On distingue les antiports (ou échangeurs) qui transportent deux ions dans des directions opposées et les symports (ou co-transporteurs) qui transportent au moins deux ions dans la même direction.

Dans les neurones, le transport du chlore se fait exclusivement grâce à la diffusion passive à travers des canaux et au transport actif secondaire via des transporteurs.

a- Les canaux perméables au chlore.

Les canaux sont répartis en différentes catégories en fonction de leurs caractéristiques biophysiques. On distingue les canaux chlore ioniques activés par un ligand (LGAC), par le calcium (CaCC), par l'AMPc (CFTR), par le volume cellulaire (VRAC) et les canaux chlores (CIC) (Duran, Thompson et al. 2010) (**Figure 11**).

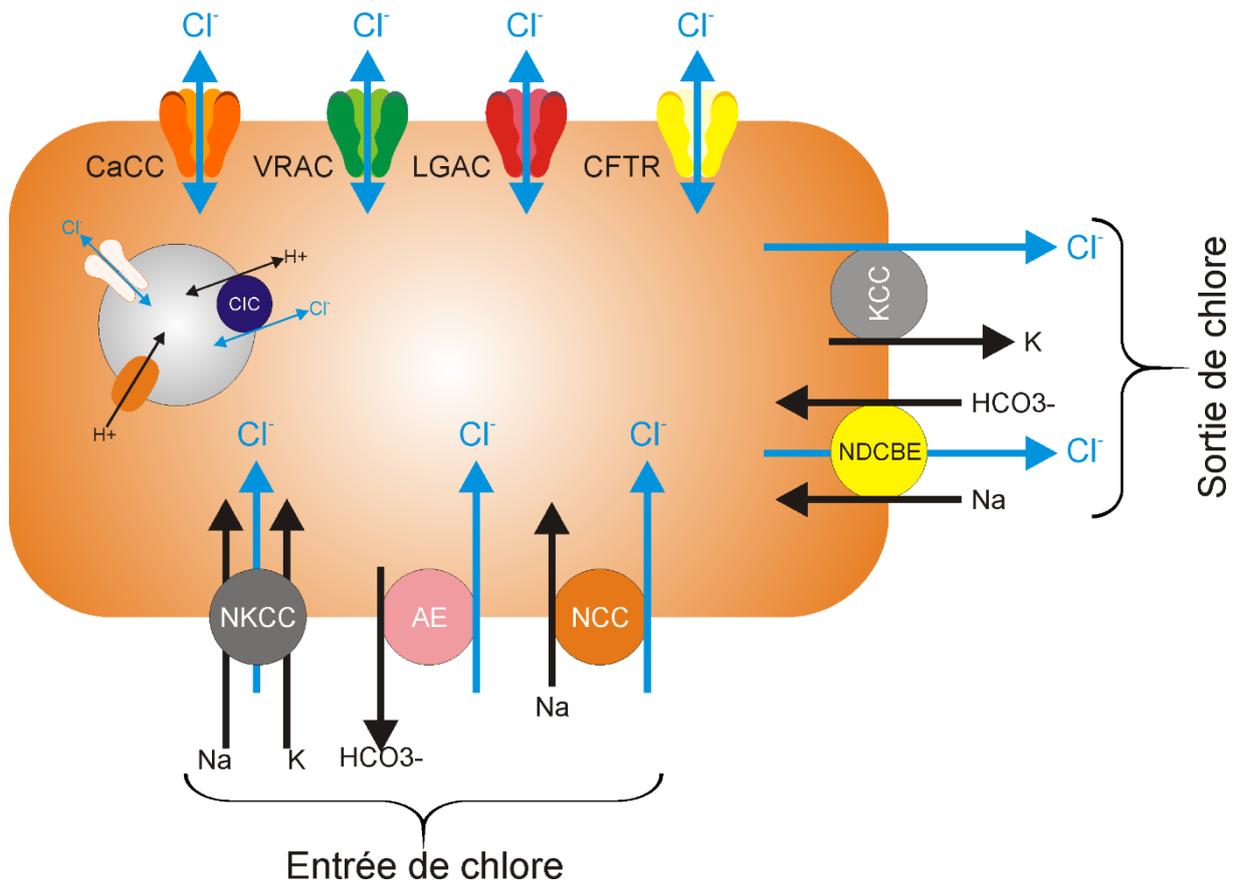


Figure 10 : Les flux de chlore à travers la membrane plasmique et vésiculaires des neurones

Le transport actif du chlore se fait par les importeurs (NKCC : $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + 2\text{Cl}^-$; AE échangeurs $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ et NCC ; co-transporteur $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$;) et les extrudeurs (KCC : co-transporteurs $\text{K}^+ + \text{Cl}^-$ et NDCBE : $\text{Na}^+ + \text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ respectivement). Les flux passifs du chlore se font à travers plusieurs canaux : les canaux ioniques ligands dépendants (LGAC) ; les canaux activés par le volume cellulaire (VRACs) ; les canaux activés par le calcium (CaCC) ; les canaux activés par l'AMPc (CFTR) ; les canaux CIC dans les vésicules.

Les LGAC sont les récepteurs précédemment décrits GABA de type A et à la glycine. Lorsque le ligand est fixé au récepteur le canal s'ouvre et devient perméable aux ions chlore et bicarbonate. Chez l'adulte, ces récepteurs sont responsables de la majorité de l'inhibition rapide dans le système nerveux central, la moelle épinière et le tronc cérébral où ils jouent un rôle important dans le contrôle moteur et la perception de la douleur. On retrouve également les récepteurs à la glycine au niveau cérébrale où ils participent également à la transmission inhibitrice.

Les VRACs sont activés en réponse à des modifications du volume cellulaire. Ils sont relativement peu connus, mais ont été observés à la membrane des astrocytes et des neurones du cortex en barils (Nilius and Droogmans 2003). Cependant, il est à noter que dans des

conditions d'ischémie les canaux VRACs sont activés à la membrane des neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe (Zhang, Cao et al. 2011).

Les canaux activés par le calcium sont regroupés en trois familles : ClCa (chloride channel calcium activated), bestrophine et anoctamine. Dans l'hippocampe, les neurones pyramidaux expriment le gène TMEM16B codant pour les CaCCs à proximité des canaux calciques et des récepteurs NMDA. Ainsi, ils permettraient de réguler la durée des potentiels d'action et la réponse synaptique en réponse à une transmission excitatrice glutamatergique (Huang and Hsu 2012).

Les canaux activés par l'AMPc ou canaux CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) sont très étudiés. Ils régulent de nombreuses fonctions biologiques telles que la régulation du trafic et la fusion vésiculaire, l'acidification des organelles, et le transport d'anions. Les CFTRs sont exprimés dans les cellules épithéliales, les poumons, les glandes salivaires, et assez largement dans le système nerveux central (Guo, Su et al. 2009). Les mutations du gène qui code pour ces canaux entraînent la mucoviscidose. Cependant, la pertinence physiologique du canal CFTR dans les neurones centraux reste à être déterminée.

Enfin, les CICs peuvent être répartis fonctionnellement en 2 groupes : les CICs 1-2, Ka/K1 et Kb/K2 qui sont exprimés à la membrane plasmique et fonctionnent comme des canaux Cl-voltage dépendants, et les CICs 3-7 fonctionnent comme des échangeurs Cl-/H⁺ et sont exprimés à la membrane des organelles intracellulaires. Ces canaux jouent un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la régulation du pH et du volume intracellulaire, le transport transépithélial et le contrôle de l'excitabilité cellulaire (Staley, Smith et al. 1996, Bi, Hong et al. 2013). Le CIC2 est exprimé à la membrane plasmique des neurones où il régule le volume cellulaire et le pH extracellulaire mais joue également un rôle dans la régulation intracellulaire du Cl⁻ (Staley, Smith et al. 1996, Jentsch 2008, Bi, Hong et al. 2013).

b- Les transporteurs du chlore.

En conditions physiologiques, les co-transporteurs NKCC1 et 2 et NCC, les échangeurs Cl⁻/HCO₃⁻ sodium indépendants et les AE (Anions exchangers) permettent le transport du Cl⁻ vers l'intérieur de la cellule. A l'opposé, les co-transporteurs KCC et les échangeurs Cl⁻/HCO₃⁻ sodium dépendants NDCBE et NDCE permettent l'extrusion du Cl⁻.

Les CICs comprennent 9 membres dont quatre co-transporteurs K⁺ Cl⁻ (les KCC1-4) ; deux co-transporteurs Na⁺-K⁺2Cl⁻ (NKCC1 et NKCC2) ; un co-transporteur Na⁺-Cl⁻ (NCC) ; et deux

co-transporteurs orphelins (CCC8 et CCC9) (**Figure 10**). Ce sont des transporteurs actifs secondaires électroneutres qui utilisent les gradients produits par la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ pour transporter le Cl^- à travers la membrane plasmique.

NKCC et KCC2 sont les deux principaux régulateurs de la concentration intracellulaire du chlore dans le système nerveux central et font l'objet de nombreuses études.

NKCC1 joue un rôle central dans l'homéostasie du chlore et donc dans la transmission GABAergique chez l'adulte mais également durant le développement du système nerveux (Ben-Ari 2002). Chez l'humain comme chez la souris, il existe deux variantes, NKCC1a et NKCC1b (1 seul chez le rat). NKCC1 est une protéine comportant 12 domaines transmembranaires dont les extrémités C et N terminales sont localisées dans le compartiment intracellulaire. Il est exprimé à la membrane de la plupart des cellules (Payne and Forbush 1995).

Le rôle principal de NKCC1 est l'accumulation du chlore dans les cellules. Cependant, il s'active lors d'une diminution du volume cellulaire, permettant son rétablissement. De plus, il a été mis évidence son rôle dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire et la maturation des réseaux neuronaux (Capo-Aponte, Wang et al. 2007, Fu, Tang et al. 2015). De façon intéressante, les souris NKCC1-KO (déficientes en NKCC1) présentent une réduction de la prolifération cellulaire dans les éminences ganglionnaires affectant notamment la formation des progéniteurs d'interneurones (Magalhaes and Rivera 2016). NKCC1 est exprimé précocement dans les neurones immatures dès E18 dans l'hippocampe ce qui augmenterait la concentration des ions Cl^- intracellulaire et induirait une action dépolarisante de la transmission GABAergique (Wang, Shimizu-Okabe et al. 2002, Khirug, Yamada et al. 2008). Il existe différents agents pharmacologiques visant NKCC1 tels que des diurétiques comme le furosémide ou la bumétanide. Le furosémide présente une affinité égale pour NKCC1 et KCC2 alors que la bumétanide a une affinité 500 fois plus élevée pour les NKCCs et est donc utilisée à faible dose pour inhiber NKCC1 et à plus forte concentration pour inhiber à la fois NKCC1 et KCC2 (**Figure 11**).

KCC2, co-transporteur du chlore et du potassium, est le principal responsable de l'extrusion du chlore dans les conditions physiologiques (Payne, Stevenson et al. 1996) et joue lui aussi un rôle crucial dans l'homéostasie du chlore et dans l'inhibition GABAergique. Chez les mammifères, il existe deux isoformes KCC2a et KCC2b qui diffèrent au niveau de leur extrémité N-terminale. Ils comportent 12 domaines transmembranaires avec les extrémités N

et C terminales localisées dans le compartiment intracellulaire et portent les sites de régulation du transporteur. En effet, la région C terminale contient un domaine ISO responsable de l'activité de cotransport de potassium et chlore en condition isotonique (Acton, Mahadevan et al. 2012). Cette région est nécessaire pour l'extrusion du chlore et des mutations génétiques de ce domaine peuvent être responsables de certaines épilepsies infantiles (Stodberg, McTague et al. 2015). KCC2 est présent de manière abondante dans la plupart des neurones du système nerveux central mature, notamment dans la moelle épinière, le thalamus, le cervelet, le cortex et bien sûr l'hippocampe (Karadsheh and Delpire 2001, Blaesse, Airaksinen et al. 2009, Medina, Friedel et al. 2014). Au niveau cellulaire, KCC2 est exprimé au niveau du soma ainsi que les dendrites (Gulyas, Sik et al. 2001, Szabadics, Varga et al. 2006). Dans l'hippocampe, KCC2 est fortement exprimé au niveau dendrite et à proximité des synapses excitatrices des épines dendritiques (Gulyas, Sik et al. 2001). En conditions physiologiques KCC2 est le seul capable d'extraire le chlore des neurones (Payne 1997). Son taux d'expression influence grandement le potentiel d'équilibre du chlore et donc la polarité de la réponse GABAergique rapide.

KCC2 joue également un rôle dans la régulation du potassium extracellulaire. En effet, le sens du transport via KCC2 a la particularité de pouvoir s'inverser : en conditions physiologiques la concentration extracellulaire de potassium est basse et KCC2 induit une sortie de potassium et de chlore. Mais si cette concentration augmente (activité neuronale accrue ou conditions pathologiques), la faible affinité de KCC2 pour le potassium extracellulaire induit une inversion du transport d'ions et donc un tamponnement du potassium extracellulaire (Payne 1997).

Les souris mutantes pour KCC2 (*kcc2* ^{-/-}) montrent un dysfonctionnement respiratoires et moteurs ainsi que des activités de type épileptiques dès E18.5 et meurent peu après la naissance (Hubner, Stein et al. 2001). De plus, les animaux déficients pour l'isoforme b de KCC2 survivent environ deux semaines mais avec des valeurs de EGABA très élevées. Les animaux hétérozygotes, c'est-à-dire qui n'expriment uniquement qu'un seul allèle du gène, ne produisent que 20% de la protéine et montrent une sensibilité accrue aux agents convulsivants (Woo, Lu et al. 2002) ainsi qu'un EGABA élevé à l'âge adulte (Riekkii, Pavlov et al. 2008). Récemment des agents ciblant spécifiquement KCC2 ont été mis au point comme le VU0463271 qui inhibent spécifiquement KCC2 (Delpire, Baranczak et al. 2012) ainsi que le CLP257 qui l'active (Doyon, Ferrini et al. 2013) (**Figure 11**).

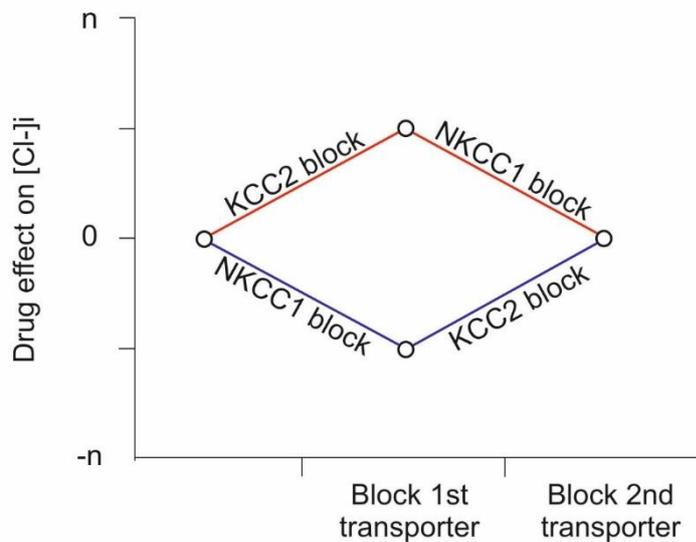


Figure 11 : Effet du blocage des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 sur la concentration intracellulaire du chlore en conditions physiologiques

En rouge, le blocage de KCC2 (VU0463271) augmente la concentration intracellulaire de Cl⁻ tandis que le blocage de NKCC1 (bumétanide) diminue cette concentration. L'expression des deux bloqueurs ne change pas les concentrations en chlore en conditions physiologiques. (Glykys, Dzhala et al. 2014)

La régulation de l'activité de KCC2 et NKCC1 est donc cruciale pour la transmission GABAergique. Cette régulation se fait via des processus de phosphorylation/déphosphorylation des parties N et C terminales intracellulaires par deux types de kinases différentes : les WNK et les PKC.

Les WNK (with no lysine [K] kinase) exercent une activité inhibitrice sur l'activité NKCC1 et KCC2. De façon intéressante l'activité de ces WNK est couplée à la concentration intracellulaire de chlore. Si les concentrations de chlore sont élevées dans le neurone, les WNK sont inactifs et n'inhibent pas l'activité de KCC2. A l'inverse si les concentrations de chlore sont trop faibles, les WNK s'activent et réduisent l'activité de KCC2. Les niveaux de chlore ont donc un effet direct sur le taux d'extrusion de cet ion en régulant l'activité de KCC2 afin de maintenir ces niveaux dans les limites physiologiques. L'activation des WNK jouerait également le rôle d'osmosenseur en régulant KCC2 et NKCC1 pour maintenir un volume cellulaire constant (Kahle and Delpire 2016).

Les PKC (protéine kinase C) contrôlent l'expression de KCC2 à la membrane plasmique en phosphorylant une sérine ce qui augmente sa stabilité à la membrane des cellules et diminue ainsi son internalisation. Également, l'activation des récepteurs 5-hydroxytryptamine type A (5-

HT2A) augmenterait l'activité de KCC2. En effet, l'application de sérotonine (agoniste naturel des récepteurs 5-HT2A) restaure l'expression membranaire des KCC2 et donc l'inhibition suite à une lésion de la moelle épinière chez la souris (Bos, Sadlaoud et al. 2013).

De façon intéressante, des travaux de Glykys montrent que le gradient chlore serait déterminé non pas par les deux co-transporteurs NKCC1 et KCC2 mais par la distribution des anions imperméants structuraux de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire les anions cytoplasmiques, y compris les groupes phosphates associés aux groupes désoxy- et ribonucléotides, et la majorité des protéines intracellulaires qui sont chargées négativement au pH physiologique. Les auteurs utilisent une méthode d'imagerie *in vitro* leur permettant d'évaluer la concentration de chlore dans les cellules tout en respectant son gradient naturel (le Clomeleon dont la fluorescence est proportionnelle aux concentrations de chlore intracellulaire). L'application d'inhibiteurs de NKCC1 et KCC2 (de la bumétanide et du VU0463271 respectivement) n'affecte pas le gradient chlore *in vitro* tandis qu'un changement de concentration des anions intra et extracellulaires modifie ce dernier (Glykys, Dzhala et al. 2014). Ces travaux suggèrent que le gradient chlore serait établi par ces anions imperméants et non pas par les co-transporteurs qui permettraient simplement d'atteindre les niveaux de chlore fixés par ces anions.

3- Inversion physiologique du gradient chlore dans le développement, GABA dépolarisant et excitateur

Comme nous l'avons vu la transmission GABAergique est directement dépendante de la concentration des ions chlore à l'intérieur des cellules. Une augmentation de la concentration de chlore dans les neurones peut entraîner un shift de la réponse GABAergique, d'une action hyperpolarisante vers une action dépolarisante voire excitatrice (via une sortie massive d'ion Cl⁻) (**Figure 12**). Les premières études qui ont montré ce « shift » ont été réalisées sur des cultures de motoneurones spinaux qui, lors d'une application de GABA (ou glycine), se dépolarisaient ou s'hyperpolarisaient en fonction de l'âge de l'embryon à partir duquel les cultures étaient préparées (Obata, Oide et al. 1978). Plus tard, le groupe de Ben Ari montra par des enregistrements intracellulaires de tranches d'hippocampe de rats que l'activation des récepteurs GABA-A dépolarisait les neurones due à une concentration élevée d'ion chlore dans les neurones immatures entre P0 (jour de naissance) et P5-P7 (Ben-Ari, Cherubini et al. 1989).

Cette action dépolarisante du GABA fut ensuite généralisée à de nombreuses espèces animales ainsi qu'à d'autres structures cérébrales comme le néocortex, l'hypothalamus, la moelle épinière, l'aire tegmentale ventrale et le cervelet (Ben-Ari 2007). En 2006, une étude a montré que juste avant la naissance le pic d'ocytocine qui accompagne l'accouchement induit une diminution de la concentration intracellulaire du chlore en inhibant l'activité de NKCC1. Durant l'accouchement le GABA hyperpolariserait/inhiberait les neurones fœtaux les protégeant du stress de l'accouchement (Tyzio, Cossart et al. 2006). Durant la séquence développementale une accumulation du chlore dans les neurones peut résulter de l'expression précoce de NKCC1 et/ou de l'expression tardive de KCC2. Durant le développement on constate une augmentation progressive de l'expression de KCC2 dès la naissance permettant le contrôle de la polarité des réponses GABAergiques (Rivera, Voipio et al. 1999, Zhu, Lovinger et al. 2005, Seja, Schonewille et al. 2012) (**Figure 12**).

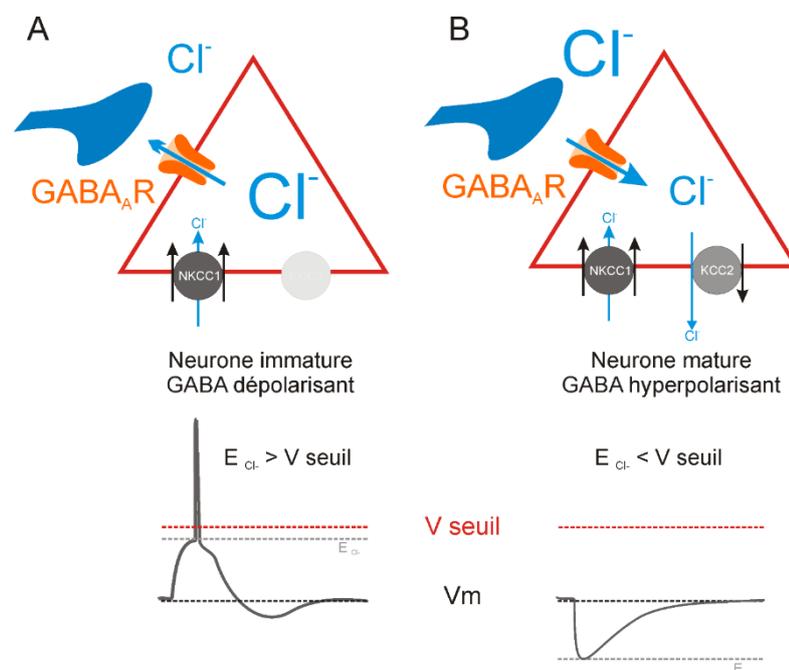


Figure 12 : Régulation développementale de l'homéostasie du chlore.

(A) Dans les neurones immatures la concentration intracellulaire de chlore est élevée en raison de l'expression tardive de KCC2 et l'expression précoce de NKCC1. Ici, le potentiel d'inversion du chlore (E_{Cl^-} et donc de la réponse GABAergique) est plus élevé que le potentiel de repos de la cellule (V_m). Lorsque le GABA se fixe sur les récepteurs GABA-A, l'ouverture du canal induit un flux sortant de chlore et donc une dépolarisation voire un potentiel d'action (si le potentiel de membrane atteint la valeur seuil V_{seuil}). (B) A l'inverse, dans les neurones matures, la concentration intracellulaire de chlore est plus basse due à l'augmentation de l'expression du transporteur KCC2. Ici le potentiel chlore est plus bas que le potentiel de repos du neurone et la fixation du GABA sur le récepteur GABA-A induit un flux entrant de chlore et une hyperpolarisation (adapté de Nardou et al 2013)

Cependant, depuis plusieurs années, cette transmission GABAergique excitatrice dans la régulation du développement neuronal fait débat dans la communauté neuroscientifique et cela pour plusieurs raisons.

Premièrement, des travaux récents ont suggéré que la réponse dépolarisante de la transmission GABAergique dans les neurones immatures résulterait du fait que ces derniers utiliseraient les corps cétoniques (pyruvate et lactate) comme substrat énergétique plutôt que le glucose comme les neurones matures (qui est utilisé classiquement en perfusion pour maintenir les tranches de cerveaux en vie lors des expériences). En effet, dans les neurones immatures les corps cétoniques sont convertis en énergie par le cycle de Krebs dans les mitochondries. Or, le glucose seul, même en grande quantité, ne suffirait pas à maintenir la respiration mitochondriale à des niveaux suffisants pour le fonctionnement neuronal optimal. Cela entraînerait un dysfonctionnement dans la stimulation des pompes, des transporteurs ou des canaux chlore, provoquant notamment une augmentation de la concentration intracellulaire de chlore et donc une réponse GABAergique dépolarisante. Dans leur étude Rheims et Holmgren montrent que la réponse GABAergique dans les neurones immatures est dépolarisante lorsque les tranches sont perfusées avec du glucose mais hyperpolarisante lorsque celles-ci sont perfusées avec des corps cétoniques (Rheims, Holmgren et al. 2009, Holmgren, Mukhtarov et al. 2010). Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par d'autres laboratoires que ce soit dans l'hippocampe ou d'autres structures cérébrales ainsi que d'autres modèles animaux (Bos and Vinay 2012, Kirmse, Kummer et al. 2015).

Deuxièmement, une difficulté majeure dans l'étude de l'inhibition GABAergique est d'éviter toute interférence avec le gradient de chlore natif, principal déterminant de la fonction inhibitrice médiée par les récepteurs GABA-A. Les premières études qui tendent à montrer l'activité dépolarisante de la transmission GABAergique sur les neurones immatures ont utilisé des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires. Cependant, la concentration de chlore intracellulaire est très labile et même des enregistrements intracellulaires avec des électrodes « sharp », qui limitent le lavage cytoplasmique, ne préservent pas l'intégrité de la membrane, altérant potentiellement le potentiel de repos et le gradient de chlore endogène. C'est pourquoi des méthodes de patch perforé à la gramicidine et d'enregistrement de canaux uniques ont été utilisées. La gramicidine est un antibiotique qui forme des pores au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ces pores sont perméables uniquement aux cations, offrant un accès électrique à la cellule mais en maintenant ainsi la concentration intracellulaire de chlore intact permettant de minimiser le problème de dialyse intracellulaire. Des

enregistrements de ce type ont également montré un effet dépolarisant du GABA durant le développement *in vitro* (Ebihara, Shirato et al. 1995, Akaike 1996). Cependant, ces enregistrements sont difficiles *in vivo*, et donnent des informations sur un seul neurone à la fois et peuvent potentiellement affecter le potentiel de repos neuronal (Chavas and Marty 2003), un paramètre majeur pour la fonction de transmission GABAergique. L'enregistrement d'un canal unique GABA-A est une méthode permettant d'enregistrer précisément la force électromotrice du GABA à travers le récepteur GABA-A (DFGABA), mais cela nécessite l'enregistrement simultané du potentiel de repos de la cellule pour en déduire le potentiel d'inversion du GABA ($EGABA = V_m + DFGABA$). Les enregistrements en cellule attachée ou de champs (activité multi-unitaire ou uni-cellulaire) permettent d'étudier la réponse d'un neurone ou d'une population de neurones suite à l'application de GABA ou d'un agoniste GABA-A. Néanmoins, ces méthodes ne respectent pas la dynamique naturelle du réseau puisqu'elle impliquent la stimulation artificielle des récepteurs GABA-A.

De plus, comme mentionné plus haut la plupart des études montrant la présence de GABA dépolarisant lors du développement du système nerveux se basent sur des études électrophysiologiques *in vitro*. Or, la procédure de coupe des tranches de cerveau serait source d'artefacts expérimentaux. Van der Pol a montré que des changements de certains facteurs (tels que l'osmolarité de la solution de perfusion ou le changement de température) ainsi que des dommages infligés aux neurones engendreraient un shift de la transmission GABAergique (inhibition vers excitation) (van den Pol, Obrietan et al. 1996). De plus, des travaux ont montré que l'activation des récepteurs GABA-A par l'isoguvacine induisait une excitation sur des tranches d'hippocampe et une inhibition sur l'hippocampe intact pour le même stade de développement (deuxième de vie post natal). Cela suggère que les neurones lésés par la coupe en surface de la tranche présenteraient une augmentation de leur concentration intracellulaire de chlore (Dzhala, Valeeva et al. 2012, Glykys and Staley 2016). L'ensemble de ces résultats remet en cause le décours de la séquence développementale de la transmission GABAergique et met en avant les limites de l'électrophysiologie *in vitro* à étudier la transmission GABAergique que ce soit durant la séquence développementale ou dans d'autres conditions où une action dépolarisante/excitatrice est suspectée.

Quelle est la pertinence de ces études *in vitro* pour l'extrapolation *in vivo* ? Quelques études tendent à montrer une réponse dépolarisante à la transmission GABAergique *in vivo* durant la première semaine de vie post-natale chez le rongeur (Tyzio, Minlebaev et al. 2008, Kirmse, Kummer et al. 2015). Même si dans leur étude Tyzio et al s'affranchissent de l'artéfact des

expérimentations *in vitro*, ils utilisent des méthodes d'enregistrements intracellulaires et patch perforé avec de la gramicidine qui, comme nous l'avons vu plus haut, ont quelques limitations. Dans leur étude, Kirmse et al utilisent de l'imagerie calcique pour étudier la réponse neuronale à une application de GABA ou de glycine. Cette technique d'imagerie est avantageuse en termes de résolution spatiale, mais n'offre pas la résolution temporelle des enregistrements électrophysiologiques et devient invasive lorsqu'elle est appliquée à des structures profondes comme l'hippocampe. En outre, l'imagerie calcique ne détecte pas les dépolarisations qui n'atteignent pas le seuil d'activation des canaux calciques et ne fait pas de distinction entre les effets dépolarisants et excitateurs pouvant entraîner une augmentation du calcium, par exemple lors d'une dépolarisation non associée à un déclenchement au potentiel d'action, ou des augmentations de calcium induites par les récepteurs GABA-A et non pas par des modifications du potentiel membranaire (Chavas, Forero et al. 2004).

C'est pourquoi, l'existence de la réponse excitatrice à la transmission GABAergique *in vivo* n'est toujours pas tranchée. En effet, chez l'animal anesthésié une stimulation optogénétique des interneurons, l'ajout de GABA ou d'un agoniste GABAergique, n'induit pas de courants excitateurs post synaptiques lors du développement (Valeeva, Tressard et al. 2016). De plus, il a été montré que la réponse GABAergique pouvait être duale, à la fois excitatrice et inhibitrice dans le cervelet (Chavas and Marty 2003) et semble dépendre de la densité des récepteurs localement ainsi que celle des co-transporteurs au chlore. Il apparaît donc que la concentration du chlore dans les neurones est un paramètre qui n'est pas fixe ce qui complexifie son étude en particulier *in vivo*. Dans la section résultat nous verrons qu'il est possible d'étudier directement *in vivo* la polarité de la transmission GABAergique tout en respectant le gradient chlore natif des neurones ainsi que la dynamique du réseau. En effet, il a été montré qu'il était possible d'enregistrer les potentiels de champs inhibiteurs en provenance des interneurons PV dans l'hippocampe et en particulier dans CA3 (Glickfeld, Roberts et al. 2009, Bazetou, Dinocourt et al. 2010, Beyeler, Retailleau et al. 2013, Dine, Kuhne et al. 2014). Ces potentiels de champs reflètent la polarité de la transmission GABAergique des pyramides de CA3 en réponse à l'inhibition périsomatique massive des interneurons PV. L'enregistrement et l'étude de ces événements extracellulaires constituent une méthode de choix pour l'étude *in vivo* de la transmission GABAergique tout en respectant le gradient chlore natif des cellules pyramidales.

C- Déficit inhibiteur et régulation du chlore dans l'épilepsie

Comme nous l'avons vu, l'homéostasie du chlore à une importance capitale dans le système nerveux immature et adulte. De nombreuses études font l'état d'une transmission GABAergique altérée dans l'étiologie de nombreuses pathologies comme l'épilepsie, la schizophrénie ou les syndromes du spectre autistique (Tyzio, Nardou et al. 2014, Deidda, Parrini et al. 2015, Cellot, Maggi et al. 2016, Doyon, Vinay et al. 2016, Di Cristo, Awad et al. 2018)

1- Epileptogénèse et ictogénèse clinique. L'épilepsie, une pathologie de la balance excitation/inhibition

L'épilepsie est un trouble neurologique fréquent qui affecte 50 millions de personnes dans le monde (de Boer, Mula et al. 2008). L'épilepsie et les crises épileptiques se définissent comme étant des phénomènes transitoires de signes et/ou symptômes dus à une activité neuronale anormalement synchrone ou excessive dans le cerveau. L'épilepsie est un trouble neurologique caractérisé par une prédisposition persistante à la production de crises et par des troubles neurobiologiques, cognitifs, psychologiques et sociaux. La définition de l'épilepsie nécessite la présence d'au moins une crise (Fisher, van Emde Boas et al. 2005). Les épilepsies sont complexes avec beaucoup de causes possibles comme les tumeurs, les traumatismes crâniens, les infections virales, les troubles neurodéveloppementaux ou même certaines mutations génétiques (Browne and Holmes 2001). Classiquement on différencie différents syndromes épileptiques : idiopathiques (maladie ou symptôme existant par lui-même), symptomatiques (dont la cause est connue comme une origine génétique) et cryptogéniques (dont la cause est inconnue). Parmi ce trouble on distingue les épilepsies généralisées (avec un départ simultané dans les deux hémisphères, des activités ictales et interictales bilatérales et synchrones dans les deux hémisphères) et les épilepsies focales ou partielles, comme l'épilepsie du lobe temporal (ELT), dont le départ de la crise ne concerne qu'un seul hémisphère, mais qui peut se généraliser aux deux. De plus, on distingue deux types d'activités épileptique : les activités interictales (qui apparaissent entre les crises) et les activités ictales (c'est-à-dire les crises).

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la forme d'épilepsie focale la plus fréquente chez l'adulte. Il en existe plusieurs catégories : celles associées à une sclérose de l'hippocampe, celles associées à d'autres lésions autres que celle de l'hippocampe comme des tumeurs

neurodéveloppementales, celles associées à une origine génétique et enfin les ELT d'origine inconnue. La plupart du temps les patients atteints d'ELT (de 30 à 60%) ont connu une convulsion dite fébrile prolongée qualifiée d'évènement inaugural durant l'enfance (Theodore, Bhatia et al. 1999). S'en suit une période dite de latence ou d'épileptogénèse pendant une dizaine d'années sans signes cliniques précédant l'apparition des crises chroniques.

Le cerveau des patients épileptiques comporte des altérations de leurs circuits, qui ont la capacité dégénérer spontanément en crises. L'aire CA3 de l'hippocampe est une région particulièrement prédisposée à cet état d'hyper-synchronicité. En effet, comme nous l'avons vu précédemment elle comporte de nombreuses connexions excitatrices récurrentes, les synapses entre les pyramides sont très plastiques et se renforcent lors de stimulations répétées. En dehors des crises, qui sont cliniquement manifestes et qui peuvent durer plusieurs dizaines de secondes, l'épilepsie est aussi caractérisée par un type d'activité se produisant entre les crises, appelée anomalie interictale (AI). Ces AI se manifestent à l'EEG par des pics brefs et amples (80-200 ms), se détachant de l'activité basale, mais n'induisent pas de symptômes cliniques. Le corrélat intracellulaire de ce type de pic est une dépolarisation synchrone d'un groupe de neurones, appelée dépolarisation paroxysmale ou *Paroxysmal Depolarizing Shift* (PDS) (Matsumoto and Marsan 1964). Ces dépolarisations sont amples, durent une dizaine de millisecondes et s'apparentent à des PPSE géants. La génération des PDS résulte d'une mécanique physiologique, comportant une phase d'excitation générée par des afférences glutamatergiques, suivie d'une phase d'inhibition par des synapses GABAergiques (Jefferys 2010). En effet, l'interconnectivité dense de CA3 présente une propension à la génération d'excitations incontrôlées si les relais excitateurs récurrents ne sont pas compensés par une inhibition forte. Cependant, les synapses glutamatergiques des récurrences de l'aire CA3 ont des probabilités de transmission relativement faibles (Miles and Wong 1986), mais la sommation temporelle de plusieurs spikes rapprochés accroît cette probabilité, et une cellule délivrant un train de spikes est susceptible d'entraîner la décharge quasi-synchrone d'une assemblée de neurones (Traub and Wong 1982, Miles and Wong 1983).

Une question importante réside dans les phénomènes donnant lieu à la transition des anomalies interictales (AI) vers les crises épileptiques. Cette transition est associée à la diminution progressive de l'inhibition des bouffées de décharge augmentant la fréquence et la durée des AI (Matsumoto and Marsan 1964, Ayala, Matsumoto et al. 1970). Ce prolongement des décharges pourrait être sous-tendu par une accumulation du potassium extracellulaire, provenant de la repolarisation des neurones après un spike, et qui lors d'activité soutenue

s'accumule dans le milieu extracellulaire. Il agit également (comme nous l'avons vu plus haut) de manière indirecte en modifiant la cinétique de certains transporteurs, en particulier KCC2, modifiant l'homéostasie du chlore et donc l'inhibition GABAergique. Ainsi, les AI comme les crises semblent résulter de phénomènes intrinsèques aux neurones, de modifications synaptiques (excitatrices et inhibitrices) et l'homéostasie des ions potassium et chlore.

La phase de latence ou d'épileptogénèse serait associée à une réaction inflammatoire, une angiogénèse exacerbée ainsi que des phénomènes de toxicité (Rigau, Morin et al. 2007, Ravizza, Gagliardi et al. 2008). L'épileptogénèse est un phénomène complexe à étudier car il est particulièrement difficile de déterminer si les modifications anatomiques et/ou fonctionnelles que l'on observe dans les modèles animaux ou chez les patients favorisent l'apparition des crises, ou sont des mécanismes de compensation suite à la crise inaugurale. Cependant, on sait que les interneurons PV contrôlent efficacement l'excitabilité cellulaire dans l'hippocampe et jouent donc un rôle dans les mécanismes de protection contre l'hyperexcitabilité. Des mutations génétiques comme celles retrouvées dans le syndrome épileptique de Dravet réduirait l'excitabilité des PV et donc altérerait l'inhibition rétrograde des cellules pyramidales (Ogiwara, Miyamoto et al. 2007, Escayg and Goldin 2010, Goldberg and Coulter 2013). Cependant, des travaux réalisés au cours de ma thèse remettent en question ces conclusions. En effet, l'inactivation pharmacogénétique spécifique des interneurons PV chez l'animal anesthésié n'a pas entraîné d'augmentation de la décharge globale des cellules pyramidales ni d'activité épileptique dans la région de CA3 mais une réorganisation de l'homéostasie de la décharge individuelle des pyramides. Ces résultats suggèrent que les interneurons PV auraient un rôle plus fonctionnel que de simplement limiter l'emballement exciteur du système (Fuchs, Zivkovic et al. 2007).

Un déficit d'inhibition GABAergique est impliqué dans la plupart des formes d'épilepsie. Bien qu'il s'agisse apparemment d'une hypothèse simple et logique à tester, la recherche d'un déficit d'inhibition GABAergique dans les tissus épileptiques se révèle méthodologiquement difficile notamment dû à la difficulté technique mais également à la grande hétérogénéité des voies de l'inhibition et les nombreux facteurs qui caractérisent sa puissance dont la principale est la régulation du chlore.

2- Epilepsie et GABA excitateur : un gradient chlore inversé ?

Des études antérieures sur différents modèles d'épilepsie ont suggéré qu'une transmission GABAergique excitatrice pourrait être impliquée dans la transition entre crises épileptiques aiguës et épilepsie chronique (Pathak, Weissinger et al. 2007, Bragin, Sanderson et al. 2009, Barmashenko, Hefft et al. 2011, Nardou, Yamamoto et al. 2011, Kourdougli, Pellegrino et al. 2017). Identifier les mécanismes cellulaires responsables de cette transition offrirait donc potentiellement des opportunités de traitement préventif contre l'épilepsie.

L'implication des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 dans l'étiologie de nombreux syndromes épileptiques a été montré dans des études sur des tissus humains (Cohen, Navarro et al. 2002, Pallud, Le Van Quyen et al. 2014, Huberfeld, Blauwblomme et al. 2015) et dans de nombreux modèles animaux (Pathak, Weissinger et al. 2007, Bragin, Sanderson et al. 2009, Barmashenko, Hefft et al. 2011, Nardou, Yamamoto et al. 2011, Raimondo, Kay et al. 2012, Chen, Wan et al. 2017, Moore, Kelley et al. 2017, Di Cristo, Awad et al. 2018, Magloire, Cornford et al. 2019). Comme décrit plus haut des souris mutantes pour KCC2 (*kcc2* ^{-/-}) sont plus sensibles aux agents convulsivants et présentent très tôt des activités épileptiques (Hubner, Stein et al. 2001, Woo, Lu et al. 2002). De plus, de nombreux modèles d'épilepsie chronique montrent une réduction de la fonction de KCC2 augmentant l'excitabilité cellulaire avec une susceptibilité accrue de déclencher des crises. D'un autre côté, des changements de l'expression de NKCC1 ont également été identifiés dans de nombreux type d'épilepsie chez l'humain et pour des modèles d'animaux (Di Cristo, Awad et al. 2018). En effet, des niveaux de NKCC1 élevés ont été trouvés dans l'hippocampe sclérosé comparé à un hippocampe contra-latéral sain dans l'épilepsie du lobe temporal (Sen, Martinian et al. 2007). Des études *in vitro* sur des tranches d'hippocampes de cerveaux humains souffrant d'épilepsie temporale ont montré que les activités interictales résultaient d'une transmission GABAergique dépolarisante (Cohen, Navarro et al. 2002, Barmashenko, Hefft et al. 2011) et serait due à une sous-expression de KCC2 (Huberfeld, Wittner et al. 2007, Huberfeld, Blauwblomme et al. 2015). De plus, le chlore s'accumulerait à l'intérieur des neurones suite à des crises d'épilepsie prolongées ce qui engendrerait une transmission GABAergique excitatrice facilitant la génération d'autres crises (Khalilov, Dzhalala et al. 1999, Huberfeld, Blauwblomme et al. 2015) et compromettrait l'efficacité des agents anticonvulsivants (qui visent à augmenter la transmission GABAergique comme les benzodiazépines) (Ben-Ari 2006). De plus, dans des modèles de souris épileptiques induits par l'injection systémique d'agent convulsivant tel que la pilocarpine, l'expression de

NKCC1 augmente jusqu'à 45 jours après l'injection alors que l'expression de KCC2 diminue (Li, Zhou et al. 2008). Ces différents résultats suggèrent qu'une mauvaise régulation du chlore par une modification de l'activité de NKCC1 et KCC2 contribuerait à la génération de syndromes épileptiques ou de l'hyperexcitabilité neuronale. Cependant, l'altération de KCC2 dans l'épilepsie semble varier d'une région cérébrale à une autre ainsi qu'avec le type de population neuronale. Il devient alors évident que les conséquences d'une altération fonctionnelle de KCC2 favorisant les crises d'épilepsie dépend du stade de la progression de la maladie et/ou de l'activité corticale durant les AI et durant les crises (Di Cristo, Awad et al. 2018). De façon intéressante, il a été montré qu'une inhibition chronique de KCC2 dans l'hippocampe de rat n'a que peu d'effet sur la signalisation du GABA, mais affecte l'excitabilité neuronale et l'activité du réseau en régulant négativement l'expression membranaire des canaux potassiques Task-3 (Goutierre, Al Awabdh et al. 2019).

Les rôles de ces deux co-transporteurs dans l'étiologie de cette maladie restent encore largement méconnus en raison des limitations technologiques dans l'étude de la transmission GABAergique *in vitro* (dialyse du contenu intracellulaire, artefact des enregistrements *in vitro*). Quelques études tendent à montrer le rôle de KCC2 dans la génération des crises (Sivakumaran, Cardarelli et al. 2015, Magloire, Cornford et al. 2019) et donc une action dépolarisante de la transmission GABAergique *in vivo* (Krook-Magnuson, Armstrong et al. 2013, Assaf and Schiller 2016). Seulement, aucune de ces études ne respecte la dynamique de l'activité synaptique spontanée (activation électrique ou optogénétique d'interneurones) et la contribution d'une transmission GABAergique excitatrice dans l'épilepsie reste donc flou.

3- Espoirs et difficultés dans la question de l'évaluation de la fonction inhibitrice et de la régulation du chlore dans la pathologie

Traditionnellement, les agents utilisés pour traiter les pathologies associées à l'homéostasie du chlore visent directement les récepteurs GABA-A comme les benzodiazépines ou les barbituriques, mais ces derniers présentent quelques limitations. En effet, des réponses paradoxales au traitement renforçant la transmission GABAergique ont été observées chez des patients présentant des troubles du développement indiquant une homéostasie du chlore dérégulée et une polarité inversée de la transmission GABAergique (Bruining, Passtoors et al. 2015). L'agent pharmaceutique le plus utilisé actuellement pour agir sur l'homéostasie du chlore est la bumétanide, un diurétique antagoniste sélectif de NKCC1 (Ben-Ari 2017).

La bumétanide a été utilisée pour prévenir les crises d'épilepsie chez les nouveau-nés. En effet, un cerveau de nouveau-né serait plus enclin à développer des crises à cause des hauts niveaux de chlore intracellulaire dans les neurones due à l'activité précoce de NKCC1 et tardive de KCC2 (Cowan 2002, Dzhala, Talos et al. 2005). L'application de bumétanide sur les tranches de l'hippocampe supprime l'activité épileptiforme *in vitro* et atténue les crises induites chez le rat nouveau-né (Dzhala, Talos et al. 2005). Également, l'application de bumétanide sur des tranches l'hippocampe néonatal n'empêche pas les crises générées par l'injection d'acide kaïnïc (KA) ni sa propagation au tissu voisin mais empêche la génération d'activité épileptique spontanée qui pourraient résulter (Nardou, Ben-Ari et al. 2009). Cependant, elle augmente la période de latence avant le développement d'une épilepsie chronique, diminue la durée moyenne des crises chez les souris traitées au KA et réduit les activités ictales dans le même modèle quand elle est coadministrée avec du diazépam (Sivakumaran and Maguire 2016). La bumétanide est également utilisée pour traiter les troubles neurologiques tels que les syndromes du spectre autistiques. Depuis de nombreuses années, les preuves s'accumulent quant à une application d'une dérégulation de l'homéostasie du chlore et donc de la transmission GABAergique dans l'étiologie de ce syndrome justifiant l'utilisation de cet agent pour tenter de traiter les patients et constitue un agent prometteur dans le traitement ces symptômes (Lemonnier and Ben-Ari 2010, Lemonnier, Degrez et al. 2012, Hadjikhani, Zurcher et al. 2015, Ben-Ari 2017, Lemonnier, Villeneuve et al. 2017).

Cependant, la capacité de la bumétanide à traverser la barrière hémato-encéphalique est contestée (Tollner, Brandt et al. 2014, Tollner, Brandt et al. 2015, Tollner, Brandt et al. 2015, Erker, Brandt et al. 2016, Kharod, Kang et al. 2019). Les effets bénéfiques de la bumétanide rapportés dans les cas d'autisme, de schizophrénie et d'épilepsie, étant donné sa faible biodisponibilité cérébrale, posent question. Les mécanismes sous-jacents de ses effets sur des troubles du développement et neuropsychiatriques, pourraient être multifactoriels en raison de la fonction NKCC1 au niveau central mais également au niveau périphérique (Vibat, Holland et al. 2001). L'étude des éventuels effets périphériques de la bumétanide permettrait de savoir si d'autres voies sont impliqués dans les effets thérapeutiques de cet agent et pourrait aider à l'avènement d'une nouvelle génération d'agents pharmacologiques.

D'autres agents thérapeutiques visant KCC2 constituent également une piste thérapeutique intéressante. En effet, l'IGF-1 aurait les mêmes effets que la bumétanide sur l'hyperexcitabilité des cellules en augmentant l'expression de KCC2, en diminuant les niveaux de chlore intracellulaire, et donc augmenterait l'efficacité du signal inhibiteur GABAergique (Kelsch,

Hormuzdi et al. 2001, Baroncelli, Cenni et al. 2017). Également, une étude a récemment montré l'intérêt d'une autre molécule : le CLP257 qui augmente l'activité de KCC2 (Doyon, Ferrini et al. 2013, Gagnon, Bergeron et al. 2013). Cependant, son mode d'action est encore méconnu et sujet à controverse (Cardarelli, Jones et al. 2017) mais pourrait constituer un agent thérapeutique de premier ordre dans le traitement de maladies associées à un défaut de l'homéostasie du chlore.

L'investigation directe de la polarité de la transmission GABAergique *in vivo* pose de sérieuses contraintes expérimentales, et l'évaluation des réponses à la transmission GABAergique est difficile. La méthode idéale préserverait entièrement les interactions entre le potentiel membranaire, la conductance, les entrées synaptiques en cours (excitatrices et inhibitrices), et la dynamique naturelle du réseau (Gulledge and Stuart 2003, Assaf and Schiller 2016, Magloire, Cornford et al. 2019). En adaptant aux conditions *in vivo* l'enregistrement extracellulaire des potentiels postsynaptiques GABAergiques unitaires précédemment décrits *in vitro* (Glickfeld, Roberts et al. 2009, Bazelot, Dinocourt et al. 2010, Beyeler, Retailleau et al. 2013), nous avons pu évaluer la polarité de la signalisation GABAergique périsomatique au cours d'une activité spontanée dans le cerveau intact dans des conditions physiologiques, pendant des crises d'épilepsie aiguës et dans un modèle d'épilepsie chronique.

I- Résultats : Reduced and reversed spontaneous GABAergic synaptic transmission in the CA3 circuit of epileptic mice in vivo

Reduced and reversed spontaneous GABAergic synaptic transmission in the CA3 circuit of epileptic mice in vivo

running title: Altered perisomatic inhibition in epilepsy

Olivier Dubanet¹, Arnaldo Ferreira¹, Andreas Frick¹, Hajime Hirase², Anna Beyeler¹, Xavier Leinekugel^{1*}

1. University of Bordeaux, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, 33077 Bordeaux, France

2. Center for Translational Neuromedicine, University of Copenhagen

*corresponding author : xavier@arcadi.eu

Abstract

Neuronal chloride gradient directly affects the polarity of GABAergic transmission, a potentially major factor of network dysfunction in a variety of brain pathologies. But the influence of $[Cl^-]_i$ on functional GABAergic transmission critically depends on the very dynamic combination of membrane potential, conductance and occurrence of other synaptic inputs. The labile properties of GABAergic transmission may explain why the contribution of excitatory GABA to epilepsy is still a contested concept, that needs to be clarified for a basic understanding of the mechanisms of epileptogenesis. Taking this complexity into account implies measuring the postsynaptic responses to spontaneously occurring GABAergic events, in vivo, without interfering with neuronal $[Cl^-]_i$. We have overcome this challenge by combining extracellular detection of unitary inhibitory postsynaptic field-potentials (fIPSPs) and silicon probe recording of the firing activity of multiple individually identified neurons. We have probed the polarity of both optogenetically-evoked and spontaneously occurring fIPSPs across the CA3 hippocampal circuit in vivo with single cell resolution. We report that transient hypersynchronized discharges induce a global reversal of the polarity of GABAergic transmission, shifting from inhibitory to excitatory for a duration of several tens of seconds before returning to normal polarity. Nevertheless this reversed polarity occurred only in the post-ictal period during which neurons (including GABAergic interneurons) are silent, which does not support a contribution of excitatory GABA to the seizures. On the other hand, we also report a more subtle effect during the course of epileptogenesis in the Kainate model of chronic

epilepsy. One week after Kainate injection, the majority of pyramidal cells escaped inhibitory control by perisomatic GABAergic events. Besides, we observed that perisomatic GABAergic transmission provided time-locked excitation of pyramidal neurons in the hippocampus, but restricted to a minor subset of neurons, and we did not observe a reversed polarity of fIPSPs. Therefore, subtle alterations in the regulation of Cl⁻ homeostasis and GABAergic transmission already operate in the hippocampal circuit during the latent period that precedes the establishment of chronic epilepsy. Independently of seizure generation, reversed GABAergic transmission might also significantly affect neuronal processing and information coding. We believe that this work will pave the way for the investigation of Cl⁻ homeostasis and inhibitory function *in vivo*, including in pathological conditions in which alteration or even reversal of GABAergic transmission is hypothesized to occur. It also constitutes an invaluable tool to quantify the actual *in vivo* efficacy of drugs designed to modulate Cl⁻ homeostasis and restore physiological GABAergic inhibition, thereby meeting high clinical and therapeutical expectations.

keywords :

GABA, inhibition, epilepsy, hippocampus, interneurons

Introduction

GABAergic inhibition relies on ionotropic GABA_A and metabotropic GABA_B receptors. The fast and time-locked inhibition considered essential for neuronal coding is the one mediated by GABA_A receptors (GABA_A R), permeable to chloride ions (Cl⁻). In normal conditions, neurons maintain a low intracellular concentration of chloride ([Cl⁻]_i), so that the reversal potential of Cl⁻ mediated currents is more negative than the resting potential (Blaesse *et al.*, 2009). GABA release therefore generates an influx of Cl⁻, with an hyperpolarizing effect on membrane potential, and inhibition of neuronal discharge.

Recent publications have proposed the implication of defective inhibition in the etiology of various pathologies including epilepsy, depression, schizophrenia, Down Syndrome or Autism Spectrum Disorders (Menendez de la Prida and Trevelyan, 2011; Cellot and Cherubini, 2014; Tyzio *et al.*, 2014; Deidda *et al.*, 2015; Doyon *et al.*, 2016; Lopez-Pigozzi *et al.*, 2016; Ben-Ari, 2017; Valero *et al.*, 2017). In vitro and in vivo experiments have suggested that defective function of the K-Cl co-transporter KCC2, that would normally extrude Cl⁻ from the cell, was responsible for a reversed polarity of GABAergic synaptic transmission from inhibitory to excitatory, participating in epileptogenesis in animal models (Pathak *et al.*, 2007; Riecki *et al.*, 2008; Bragin *et al.*, 2009; Barmashenko *et al.*, 2011; Nardou *et al.*, 2011; Ellender *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Di Cristo *et al.*, 2018; Magloire *et al.*, 2019) as well as in human tissue resected from epileptic patients (Cohen *et al.*, 2002; Huberfeld *et al.*, 2007; Pallud *et al.*, 2014). But one major difficulty in the study of GABAergic inhibition is to avoid artefactual interference with the native Cl⁻ gradient, a main determinant of GABA_A R mediated inhibitory function. Perforated-patch clamp recordings with the compound antibiotic gramicidin provide electrical access to the cell through the formation of pores in the membrane, permeable to cations but impermeant to Cl⁻. Perforated-patch recordings with gramicidin have been successfully used in vitro to record GABAergic synaptic currents, while keeping intracellular Cl⁻ unaffected by the pipette solution (Gulledge and Stuart, 2003; Pathak *et al.*, 2007; Barmashenko *et al.*, 2011; Ellender *et al.*, 2014). But previous work has also demonstrated that Cl⁻ gradient can be affected by the slicing procedure (van der Pol *et al.*, 1996; Dzhala *et al.*, 2012; Valeeva *et al.*, 2016), questioning the claims for excitatory GABAergic transmission based on in vitro recordings (Valeeva *et al.*, 2016).

In vivo treatment with the diuretic bumetanide, which also reduces the accumulation of Cl⁻ ions in neurons through the inhibition of the Cl⁻ intruder NKCC1, was found to reduce

behavioural abnormalities in rat and mouse models of Autism Spectrum Disorders (Tyzio *et al.*, 2014) and seizures in animal models of epilepsy (Dzhala *et al.*, 2005; Kahle and Staley, 2008; Brandt *et al.*, 2010; Marguet *et al.*, 2015; Kourdougli *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). But bumetanide has a limited bio-availability in the brain due to poor blood brain barrier penetration (Puskarjov *et al.*, 2014; Donovan *et al.*, 2016; Römermann *et al.*, 2017), and it is finally unclear if its action in vivo was indeed due to the restoration of neuronal Cl⁻ gradient and inhibitory GABAergic transmission.

Direct investigation of the polarity of GABAergic transmission in vivo puts serious constraints in terms of experimental access, and the evaluation of responses to spontaneous synaptic GABA_A R activation is challenging. The ideal method would fully preserve the exact spatio-temporal interactions between membrane potential, conductance and ongoing synaptic inputs (both excitatory and inhibitory), which natural dynamics are highly complex and yet critical for the net inhibitory or excitatory effect of GABAergic transmission (Lu and Trussell, 2001; Gullledge and Stuart, 2003; Lovett-Barron *et al.*, 2012; Astorga *et al.*, 2015; Assaf and Schiller, 2016; Magloire *et al.*, 2019). Adapting to in vivo conditions the extracellular recording of unitary GABAergic postsynaptic potentials (field IPSPs) previously described in vitro (Glickfeld *et al.*, 2009; Bazelot *et al.*, 2010; Beyeler *et al.*, 2013), we could evaluate the polarity of perisomatic GABAergic signaling during spontaneous activity in the intact brain. Our results provide direct evidence for depolarizing actions of perisomatic GABAergic transmission and time-locked excitation of CA3 pyramidal neurons in acute and chronic mouse models of epilepsy, but little contribution of excitatory GABA to epileptogenesis. We believe that this demonstration will pave the way for the investigation of Cl⁻ homeostasis and inhibitory function in vivo, in physiological conditions and in situations in which alteration or even reversal of GABAergic transmission is hypothesized to occur. It also constitutes an invaluable tool to quantify the actual in vivo efficacy of drugs designed to modulate Cl⁻ homeostasis and restore physiological GABAergic inhibition, thereby meeting high clinical and therapeutical expectations.

Results

Extracellular recording of perisomatic field-IPSPs and time-locked inhibition of CA3 pyramidal cell firing in vivo.

Non-invasive recording of the dynamics of GABAergic synaptic transmission in vivo is a challenge. Previous work in vitro has suggested that perisomatic inhibitory postsynaptic signals originating from individual interneurons (basket and chandelier cells) could be recorded as extracellular field potentials (fIPSPs) from their target pyramidal-cell population (Glickfeld *et al.*, 2009; Bazelot *et al.*, 2010; Beyeler *et al.*, 2013). This approach offers several main advantages. First, extracellular recordings preserve native $[Cl^-]_i$ and other cytoplasmic factors critical for GABAergic transmission (Glykys *et al.*, 2014). Second, the polarity of the field events indicates the direction of the current elicited in the target population of pyramidal cells, thereby addressing the question of depolarizing vs hyperpolarizing polarity of GABAergic postsynaptic signaling. And third, combined with units recording and spike sorting of neuronal discharges, extracellular detection of population fIPSPs provides a time reference to investigate the net effect of GABAergic perisomatic synaptic signals on the firing of the target neurons with single cell resolution, allowing a direct quantification of the efficacy of inhibition or excitation provided by perisomatic GABAergic inputs.

In order to evaluate the efficiency and polarity of perisomatic GABAergic transmission in the hippocampus in vivo, we have therefore inserted silicon probes into the dorsal CA3 pyramidal layer of urethane-anesthetized mice, recording spontaneous local field potentials and unitary neuronal activity. As illustrated in Fig. 1, spontaneous activity from the CA3 pyramidal layer included action potentials (units) and positive local field events with a profile similar to that of fIPSPs previously described in vitro as the GABA_A receptor mediated postsynaptic potentials originating from PV interneurons (Beyeler *et al.*, 2013). Accordingly, these events were characterized by a fast rise time and a slow decay (time to peak, 2.01 ± 0.53 ms, exponential decay time-constant, 3.65 ± 0.05 ms, $n=8$ mice), and showed the pharmacological profile of GABA_A R-mediated IPSPs. The GABA_A modulator Zolpidem (10 mg/kg, IP) increased both their amplitude (from $190 \pm 11.61 \mu V$ to $208.67 \pm 10.01 \mu V$, $n=5$ mice, $t(4)=-4.93$ $p<0.01$) and decay time-constant (from 4.66 ± 0.36 ms to 13.07 ± 4.18 ms, $n=5$ mice, $p<0.01$, two-tailed paired t-test, $t(4)=-4.62$). And as illustrated in Supplementary Fig. 1b, their frequency of occurrence

was reduced but fIPSPs persisted in presence of locally injected glutamatergic antagonists (at a dose that efficiently abolished the glutamatergic LFP response evoked by the contralateral electrical stimulation of CA3 inputs), while they were fully blocked by the GABA_A R antagonist bicuculline (frequency of occurrence, $16.3 \pm 5.6\%$ of control in APV+DNQX, 5 and 2mM respectively, 200 to 300nl, 0% of control in presence of bicu 100 μ M, 200nl, with or without APV+DNQX, n=3 mice, 1 way ANOVA, $F(3) = 872.37$, $p < 0.001$, Bonferroni post hoc test). As observed in vitro and expected from perisomatically projecting interneurons (basket and chandelier cells), in vivo fIPSPs provided very powerful time-locked inhibition of local pyramidal cells. Accordingly, multi-unit pyramidal cell activity was almost fully interrupted by fIPSPs, as observed in the traces shown in Fig. 1b and in the trough that follows fIPSPs in the peri-event time histogram (PETH) shown in Fig. 1d-e. Beside the peak firing that precedes fIPSPs and probably reflects the recruitment of perisomatic inhibition by pyramidal cells discharge (Beyeler *et al.*, 2013), most of the 389 putative pyramidal cells obtained from 18 mice were significantly inhibited by fIPSPs ($71.1 \pm 12.9\%$, n=18 mice), resulting in a population firing reduced by $83.5 \pm 10.4\%$, returning to baseline values after 10.2 ± 3.5 ms (n=18 mice).

Perisomatic fIPSPs specifically originate from PV interneurons and provide homeostatic redistribution of individual pyramidal cells firing rates in the CA3 hippocampal network.

In order to verify that fIPSPs actually originate from PV interneurons, we recorded the extracellular field-potential responses to the optogenetic activation of PV interneurons. PV-Cre mice were injected with the DIO hChR2 (E123T/T159C)-EYFP construct in the CA3 region in order to express the cationic actuator ChR2 specifically in PV interneurons. PV immunostaining of the infected mice showed excellent specificity, with 96 to 100% ($98.3 \pm 2\%$, n=3 mice) of the infected (GFP-positive) cells being also PV-positive (Supplementary Fig. 2a). As illustrated in Fig. 2, brief (2ms) local optogenetic activation of PV interneurons did evoke reliable fIPSPs, together with powerful time-locked inhibition of local pyramidal cells (n=33 pyramidal cells from 5 mice). Evoked fIPSPs (n=5 mice) had a longer decay time constants (5.45 ± 1.15 ms for evoked vs 4.11 ± 0.73 ms for spontaneous, $t(4)=2.93$, $p < 0.05$), a faster rise time (1.54 ± 0.15 vs 1.96 ± 0.15 ms, $t(4)=-3.38$, $p < 0.01$) and a larger amplitude (287.5 ± 40.53 μ V vs 218.1 ± 15.48 μ V, $t(4)=-3.19$, $p < 0.05$) than spontaneous fIPSPs. As illustrated in Supplementary Figure 1, the success rate of PV-interneurons optogenetic stimulation to evoke fIPSPs was not significantly affected by the local presence of the glutamatergic receptor antagonists APV and

DNQX, but evoked fIPSPs were fully (and reversibly) blocked by the GABA_A R antagonist bicuculine (success rate 81.5±7.1% in control, 91±11.6% in APV+DNQX, 0% in bicu, with or without APV+DNQX, n= 3 mice ANOVA, F(3) = 162.15 1 way p<0.001 Bonferroni post hoc test). PV interneuron firing is therefore sufficient to evoke fIPSPs. In order to know whether other types of interneurons also significantly contributed to the generation of perisomatic fIPSPs during spontaneous CA3 activity, PV-Cre mice were injected with the FLEX-rev::PSAML141F,Y115F:GlyR-IRES-GFP construct to express the inhibitory pharmacogenetic actuator PSAM-GlyR specifically in PV interneurons. PV immuno-staining of the infected mice showed that in addition to high specificity (99±1%, n=3 mice), 98±1 % (n=3 mice) of the PV-positive cells in the region of recording were also GFP-positive (Supplementary Fig. 2b), indicating that most PV interneurons expressed PSAM-GlyR. As illustrated in Fig. 3g-h, the pharmacogenetic inhibition of PV interneurons induced by local injection of the exogenous ligand PSEM-89S suppressed 92.6±9.7% (median=97%, n=5 mice) of spontaneous fIPSPs, from 6.58±3.5 to 0.45±0.66 events/s (n= 5 mice, p<0.05, two-sided Wilcoxon Mann-Whitney Test), suggesting that the recorded fIPSPs originated predominantly from PV interneurons.

Even though pharmacogenetic silencing of PV interneurons in the anesthetized mouse did not increase the global firing rate of the CA3 pyramidal cell population (Fig. 3i, 1.19±2.72Hz in control vs 0.96±1.04Hz in PSEM-89S, n=5 mice, NS, two-sided Wilcoxon Mann-Whitney Test; pairwise comparisons from 5 mice: 7 to 16 cells in baseline, 11 to 19 in PSEM 1-way ANOVA, F(1)=1.51, NS), it did affect individual cells firing. As illustrated in Fig. S3, the correlation coefficient between individual cells firing rates in consecutive epochs of 10min indicated a remarkable stability, both in baseline (r=0.987, p<0.001) and after PV interneuron silencing (r=0.79, p<0.001). Application of PSEM-89S in transgenic PV-Cre mice not injected with the PSAM-GlyR viral construct did not affect global hippocampal activity (average global pyramidal firing rate, 0.6±0.21Hz in control vs 0.59±0.18Hz with PSEM-89S; fIPSP frequency of occurrence, 6.72±1.71Hz in control vs 6.31±1.44Hz with PSEM-89S, n= 5 mice, Wilcoxon Mann Whitney ranks test, NS) or pyramidal cells individual firing rates (correlation coefficient between individual cells firing rates, r = 0.94, n=46 pyramidal cells from 3 mice). On the other hand, as illustrated in Fig. 3i, the firing rates before vs after PSEM-89S in PV-Cre mice expressing PSAM-Gly-R were hardly correlated (r=0.4, n=35 pyramidal cells from 3 mice), even after removing the values of the 4 outlier cells which average firing rates were above 1Hz in control condition (r = 0.35, n=31 pyramidal cells from 3 mice), indicating that PV interneuron

silencing induced a redistribution of firing rates among pyramidal neurons within the CA3 circuit.

Depolarizing and excitatory perisomatic GABAergic transmission in acute seizures in the drug-free mouse.

The reversal potential of Cl⁻-mediated GABAergic currents (E-GABA) is controlled by the passive movement and active transport of Cl⁻ through various ionic channels and transporters in the plasma membrane. During spontaneous activity, Cl⁻ ions flowing through GABA_A channels tend to shift the reversal potential of GABAergic currents toward membrane potential. Changes in external [K⁺] will also affect K-Cl cotransport and Cl⁻ gradient. E-GABA is therefore a very dynamic process that depends on ongoing fluctuations of membrane potential, GABAergic conductances and network activity. During seizures, GABA is massively released by interneurons while pyramidal cells are depolarized, therefore getting loaded with Cl⁻ until extrusion mechanisms restore an hyperpolarizing Cl⁻ gradient. It is therefore expected that due to the time course of Cl⁻ extrusion, high Cl⁻ load and excitatory GABA might participate in a deficit of inhibition immediately after a seizure (Fujiwara-Tsukamoto *et al.*, 2003; Ellender *et al.*, 2014). However, the time dynamics of spontaneous GABAergic synaptic transmission and Cl⁻ gradient through the interactions between the fluctuations of membrane potential and intrusion and extrusion systems, that have been studied *in vitro*, largely remain to be characterized *in vivo*. As illustrated in Fig. 4, taking advantage of fIPSPs as a non invasive index of the polarity of GABAergic currents in the CA3 pyramidal population, we have investigated the dynamics of perisomatic inhibition during acute interictal and ictal seizures in awake mice. Spontaneous fIPSPs in the head fixed condition had a higher frequency of occurrence than under urethane anesthesia (4.13 ± 1.30 vs 8.57 ± 2.05 Hz, $t(8)=3.63$, $p<0.01$) but in both conditions they had similar rise times (1.81 ± 0.23 vs 1.956 ± 0.15 ms, $t(8)=1.03$, NS), decay time constants (3.65 ± 0.45 vs 4.11 ± 0.73 ms, $t(8)=1.04$, NS) and amplitudes (206.4 ± 9.35 vs 218.1 ± 15.48 μ V, $t(8)=-0.35$, NS).

In order to monitor both spontaneous and evoked fIPSPs, PV-Cre mice were infected with the DIO-hChR2-EYFP construct in the CA3 region. Light stimulation with a locally positioned optical fiber provided evoked fIPSPs by direct stimulation of PV interneurons. Acute seizures

were induced by a brief and focal intra-hippocampal injection of the convulsive agent bicuculline in the contralateral hemisphere. Electrophysiological recordings displayed both interictal activity and hippocampal ictal seizures, recognized as complex events lasting 30 to 40 seconds ($37.4 \pm 9.3s$, $n=14$ seizures from 7 mice), even though the animal did not show behavioural convulsions. Because the network can be durably altered by many repeated evoked seizures, even at times resulting in spontaneous seizures, we have decided to select only the first 2 or 3 evoked seizures of each animal, for homogeneity and to avoid the confound of a transition towards spontaneously recurring seizures. Optogenetic stimulations (2ms, 0.5Hz) were delivered without interruption throughout the recording session, but we observed that spontaneous and evoked fIPSPs were transiently interrupted upon ictal seizure onset. While in comparison to baseline, fIPSPs were not significantly affected between epileptic discharges, they transiently appeared with a reversed polarity after the termination of ictal seizures (latency to normal polarity, 119 to 406s, $224.5 \pm 259s$, $n=7$ mice totalizing 14 seizures), suggesting transiently reversed polarity of GABAergic transmission after ictal seizures, but not after acute interictal discharges. Reversed fIPSPs often ($n=9$ over 14 seizures from 7 mice) entrained the discharge of postsynaptic target neurons, as illustrated by the short-latency action potentials evoked by fIPSPs in the traces of Fig. 4c and in the peri-event histogram between reversed fIPSPs and pyramidal cell firing activity in Fig. 4e ($n=3$ cells from a total of 42 putative pyramidal cells). The short latency (range 1-3ms) between fIPSP onset and pyramidal spike firing is compatible with direct excitation but not previously described rebound from inhibition (Cobb *et al.*, 1995; Assaf and Schiller, 2016; Chang *et al.*, 2018). No more fIPSP-related excitatory interactions were seen after the recovery of the polarity of fIPSPs. These results suggest that an ictal seizure can entrain transient depolarizing and excitatory actions of perisomatic GABAergic transmission in the CA3 circuit, although restricted to a limited fraction of the neuronal population. Moreover, the expression of excitatory GABA, in terms of time-locked post-synaptic action potential firing, was confined to the post-ictal period devoid of spontaneous neuronal activity. This does not support a strong involvement of excitatory GABAergic transmission in spontaneous post-ictal activity, and highlights the importance of probing the polarity of spontaneous GABAergic synaptic transmission in addition to the responses evoked by experimental stimulations.

Discrete excitatory perisomatic GABAergic transmission in a chronic model of epilepsy.

Acute ictal seizures, as induced experimentally by the injection of the convulsive agent kainic acid (KA), can turn into chronic epilepsy after a silent period of up to several weeks. Previous studies on various model of epilepsy have suggested that reversed (excitatory) GABAergic transmission might be involved in the transition between acute seizures and chronic epilepsy (Pathak *et al.*, 2007; Bragin *et al.*, 2009; Barmashenko *et al.*, 2011; Nardou *et al.*, 2011; Töpfer *et al.*, 2014; Kourdougli *et al.*, 2017). This condition is of high clinical relevance because incident occurrence of isolated seizures in human is known to be a main factor for the development of chronic epilepsy after a latent period that can last from months to several years (French *et al.*, 1993). Identifying the cellular mechanisms responsible for this transition would therefore potentially offer opportunities for preventive treatment against epilepsy.

We have evaluated the dynamics of perisomatic inhibition in the CA3 hippocampal region of anesthetized KA-treated mice during the latent period, one week after KA injection in the contralateral hippocampus, therefore at a stage when the animals are not yet epileptic (Riban *et al.*, 2002). All KA-treated mice experienced acute status epilepticus. As illustrated in Fig. 5b and 6c, interictal discharges were present in all KA-treated mice (frequency of occurrence, 0.012 ± 0.014 Hz, $n = 23$ mice), but in none of the control animals ($n = 18$ mice). As illustrated in Fig. 5c, among all identified fIPSPs, none appeared of reversed polarity, whether spontaneous or evoked by the optogenetic activation of PV interneurons, in control ($n=18$ WT and 5 PV-ChR2 mice injected with Cre-dependant ChR2) or in KA-treated mice ($n=8$ WT and 15 PV-ChR2 mice injected with Cre-dependant ChR2), suggesting that GABAergic transmission remained globally hyperpolarizing at the network level. Nevertheless, because the polarity of fIPSPs represents the average response of all the local pyramidal targets of the discharging presynaptic interneuron(s), the possibility remained that a subpopulation of pyramidal cells might be depolarized or even excited by GABAergic transmission in spite of a globally hyperpolarizing fIPSP population response. We therefore evaluated the responses of individual neurons to spontaneous fIPSPs, and indeed identified a minority of neurons ($n=4$ out of 78 putative pyramidal cells from 3 KA-treated mice, among a total of 707 putative pyramidal cells from 23 KA-treated mice) that fired action potentials in response to GABAergic synaptic inputs. Individual examples of putative pyramidal cells displaying the three distinct types of observed responses to spontaneous fIPSPs (time locked excitation, time-locked inhibition, or no clear change in net firing rate) are illustrated in Fig. 5. In fact, the most striking alteration of

perisomatic inhibitory function in KA-treated mice is a loss of inhibitory control over most of pyramidal neurons. As illustrated in Fig. 6, the frequency of occurrence of fIPSPs was not significantly different in control and KA-treated mice (control, 7.99 ± 3.39 Hz, $n=18$ mice; KA-treated, 8.51 ± 2.96 Hz, $n = 23$ mice; NS, two sample t-test, $t(39) = -0.52$ $p=0.6$), but only $34.4 \pm 32.3\%$ of putative pyramidal cells were inhibited by spontaneous fIPSPs in KA-treated mice (median 25%, $n=23$ mice for a total of 703 cells) vs $71.7 \pm 12.9\%$ in control animals (median 71.7%, $n=18$ mice for a total of 389 cells; MannWhitney test $p<0.001$). Putative pyramidal cells from KA-treated mice that were inhibited by fIPSPs presented the same strength and kinetics of inhibition as neurons from control mice (strength of inhibition: control, $90.6 \pm 1.9\%$, $n=18$ mice for a total of 280 inhibited pyramidal cells; KA-treated, $90.8 \pm 9.2\%$, $n=23$ mice for a total of 346 inhibited pyramidal cells, NS, MannWhitney test, $p=0.87$; time before recovery from inhibition: control, 7.92 ± 1.85 ms, $n=18$ mice for a total of 280 pyramidal cells; KA-treated, 8.22 ± 1.73 ms, $n=23$ mice for a total of 346 pyramidal cells; NS, MannWhitney test, $p = 0.2$). Overall, pyramidal population activity was about 50% lower in KA-treated mice than in control (control, 0.81 ± 0.32 Hz, $n=18$ mice for a total of 390 pyramidal cells; KA-treated, 0.39 ± 0.23 Hz, $n = 23$ mice for a total of 703 pyramidal cells; MannWhitney test, $p<0.001$), in line with the hypothesis that perisomatic inhibitory function is not the main determinant of quantitative population activity in the CA3 hippocampal circuit. In future studies, it might be interesting to investigate at various delays after an acute seizure episode whether the observed inter-individual heterogeneity in the fate of perisomatic inhibitory function across KA-treated mice is involved in the distinct phenotypic outcome of individual animals, differentially affected by the initial insult.

Discussion

The possibility that altered Cl^- homeostasis and functionally reversed GABAergic transmission (from inhibitory to excitatory) might be involved in major pathologies such as epilepsy, autism spectrum disorders or schizophrenia, has recently raised considerable interest (Cohen *et al.*, 2002; Huberfeld *et al.*, 2007; Pathak *et al.*, 2007; Kahle and Staley, 2008; Bragin *et al.*, 2009; Barmashenko *et al.*, 2011; Nardou *et al.*, 2011; Löscher *et al.*, 2013; Tyzio

et al., 2014; Deidda *et al.*, 2015; Marguet *et al.*, 2015; Doyon *et al.*, 2016; MacKenzie *et al.*, 2016; Ben-Ari, 2017; Chen *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). However, a direct assessment of this hypothesis has been hindered by the technical difficulty of probing endogenous GABAergic synaptic function *in vivo*, because it implies to minimize perturbation of cytoplasmic content, membrane potential and natural synaptic GABAergic activity (Glykys *et al.*, 2014). The difficulties reside in both the recording methods and the activation of GABAergic transmission. Neuronal $[Cl^-]_i$ is very labile and even intracellular recordings with sharp electrodes, which limit cytoplasmic wash-out, do not preserve membrane integrity, potentially altering resting potential and endogenous Cl^- gradient. Patch clamp (cell-attached) recordings are challenging *in vivo*, yield information about a single neuron at a time, and potentially affect neuronal resting potential (Chavas and Marty, 2003), a major parameter for the function of GABAergic transmission. Imaging techniques (eg of calcium or chloride) are advantageous in terms of spatial resolution, but do not offer the time resolution of electrophysiological recordings and get invasive when applied to deep structures. Calcium imaging, in addition, does not detect depolarizations that do not reach the threshold of calcium channel activation, and hardly discriminates between depolarizing and excitatory effects that can both result in calcium increases, for example during a shunting depolarization not associated with action potential firing (Kirmse *et al.*, 2015), or GABA_A-induced calcium increases not mediated by changes in membrane potential (Chavas *et al.*, 2004). As for the activation of GABA_A-R, neither the exogenous applications of GABAergic agonists, nor the electrical or optogenetic activation of GABAergic inputs used in previous studies (Krook-Magnuson *et al.*, 2013; Minlebaev *et al.*, 2013; Astorga *et al.*, 2015; Kirmse *et al.*, 2015; Assaf and Schiller, 2016; Valeeva *et al.*, 2016; Magloire *et al.*, 2019), respect the dynamics of spontaneous synaptic transmission. For example, boosting Cl^- extrusion through KCC2 was recently shown to nicely prevent the prolongation of seizures induced by the optogenetic activation of PV interneurons, but had no effect on spontaneous, ongoing seizures (Magloire *et al.*, 2019). Therefore, in spite of a reversed Cl^- gradient and GABAergic polarity with important functional consequences if activated optogenetically, there is no evidence in this study that excitatory GABAergic transmission functionally participated in spontaneous ongoing seizure activity. Another caveat is that different types of interneurons interact with each other, such as the mutually inhibiting PV and SOM-expressing interneurons (Lovett-Barron *et al.*, 2012). Experimental manipulation of specific interneurons (eg PV) may therefore also influence seizure expression indirectly by the modulation of pyramidal cells' GABAergic inputs from

other interneurons. This illustrates the potential confound of interpreting the effects of GABAergic activation at the network level rather than getting a direct readout of monosynaptic, spontaneous GABAergic transmission.

On the other hand, previous work *in vitro* suggested that the direct postsynaptic response of hippocampal pyramidal cells to their spontaneously occurring perisomatic GABAergic inputs could be recorded extracellularly, as field-Inhibitory Postsynaptic Potentials (fIPSPs), and that the polarity of fIPSPs could be used as an index of Cl^- gradient and polarity of GABAergic transmission. Indeed, perisomatically projecting interneurons (basket and chandelier cells) have a densely arborised axon specifically confined to the pyramidal cell layer, and contact a large proportion of pyramidal cells within a restricted projection area (Buhl *et al.*, 1994; Sik *et al.*, 1995). Therefore, each action potential of the interneuron triggers the nearly synchronous release of GABA on hundreds of target pyramidal cells, which postsynaptic responses (IPSPs) sum up and can be readily identified from a local extracellular electrode (Glickfeld *et al.*, 2009; Bazelot *et al.*, 2010; Beyeler *et al.*, 2013), with a polarity reflecting that of the Cl^- gradient (Glickfeld *et al.*, 2009; Bazelot *et al.*, 2010). This approach is well suited to preserving endogenous $[\text{Cl}^-]_i$, can be performed *in vivo*, and opens the possibility to resolve the dynamics of Cl^- gradient and polarity of GABAergic transmission over the course of ongoing synaptic activity. A strong limitation however is that fIPSPs are the average response of multiple pyramidal cells and therefore lack the resolution of individual cells, so that changes in GABAergic polarity could be detected if they affect the whole neuronal population but may be missed if affecting only a subset of cells. Moreover, as mentioned before, GABAergic transmission involves both voltage and conductance changes, so that reversed Cl^- gradient and depolarizing GABA carry a complex combination of excitatory (through depolarization) and inhibitory (through increased conductance) influences (Staley and Mody, 1992; Lu and Trussell, 2001; Gullledge and Stuart, 2003; Tyzio *et al.*, 2008; Khalilov *et al.*, 2015; Kirmse *et al.*, 2015). As a consequence, determining the net postsynaptic effect of GABAergic transmission requires a direct readout of postsynaptic firing activity. For all these reasons, we now propose that the method of choice to probe Cl^- gradient and GABAergic synaptic function *in vivo* lies in combined multi-electrode recording and spike-sorting methods. While fIPSPs provide the timing and global (average) polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic events, the distributions (peri-event time histograms) of the spikes of individually identified neurons provide the net functional effect of GABAergic transmission, with single cell resolution.

In line with previous *in vitro* evidence for the direct involvement of basket and chandelier cells in the generation of fIPSPs (Glickfeld *et al.*, 2009; Bazelot *et al.*, 2010; Beyeler *et al.*, 2013), we provide direct evidence that *in vivo* fIPSPs originate mostly from PV interneurons, because they were elicited by the optogenetic activation of PV interneuronal firing, and largely eliminated by the pharmacogenetic inhibition of PV interneuronal firing. Perisomatic inhibition is considered to be functionally optimal for the control of neuronal discharge, with synapses strategically located on the soma and close to the site of action potential initiation (Miles *et al.*, 1996; Somogyi and Klausberger, 2005). PV basket and chandelier cells are thus considered to play a major role in the control of pyramidal cells firing through time-locked inhibition, presumably preventing excessive firing within the hippocampal circuit. However, in spite of the critical importance of inhibitory control over the recurrent CA3 circuit, the literature is strikingly missing direct reports of the dynamics of excitatory-inhibitory interactions in CA3, presumably because of the technical difficulties to identify perisomatic inhibitory events *in vivo*. Our experimental results confirm that perisomatic GABAergic transmission provides very powerful time-locked inhibition of most CA3 pyramidal neurons. An interesting observation is that the blockade of PV interneuron firing was responsible for a redistribution of pyramidal cell activity, but was not accompanied by any major quantitative change of activity at the network level. This suggests that in the CA3 hippocampal region, perisomatic inhibition may be involved in the control of the timing of pyramidal cells discharge rather than quantitative control of the network discharge. Previous reports are compatible with this hypothesis. In a previous study conducted *in vitro*, we have reported that fIPSPs were rather poorly recruited by network activity, suggesting that perisomatic inhibition should be more efficient in shaping the timing of spike flow than in limiting excitatory runaway recruitment and preventing the generation of hyper-synchronized discharges. Previous report that transgenic mice with specifically disrupted glutamatergic inputs to parvalbumin-positive interneurons displayed hippocampo-dependent spatial memory impairment but no epileptic phenotype are also in support of this interpretation (Fuchs *et al.*, 2007; Racz *et al.*, 2009).

But one major advantage offered by the extracellular recording of fIPSPs is the possibility to evaluate the efficiency, and even the polarity, of perisomatic GABAergic transmission in a variety of conditions, including pathological conditions in which GABAergic transmission is suspected to be affected, or even reversed, due to altered neuronal Cl⁻ homeostasis. Cl⁻ gradient is dependent on a number of factors, including membrane potential, the distribution of intra and extracellular impermeant anions, osmotic pressure, ionic content of the extracellular milieu (eg

[K⁺]), recent neuronal activity involving Cl⁻ currents, and the dynamics of pumps and transporters involved in maintaining physiological Cl⁻ gradient (Glykys *et al.*, 2014; Goutierre *et al.*, 2019). Our experiments have tested the possibility to detect the consequences of both acute seizures and chronic epilepsy on Cl⁻ regulation and GABAergic transmission. We report that transient hypersynchronized discharges induce a global reversal of neuronal Cl⁻ gradient and polarity of GABAergic transmission, shifting from inhibitory to excitatory for a duration of several tens of seconds before returning to normal polarity and efficiency. The strongly depolarized membrane potential induced by ictal seizures (depolarizing block) is not in favour of a depolarizing Cl⁻ gradient and excitatory GABAergic transmission. On the other hand, subsequent neuronal hyperpolarization is likely to occur due to the activation of Ca-dependent potassium channels activated by the massive Ca increase that takes place in neurons during the post-ictal depolarizing block. We hypothesize that the fIPSPs of reversed polarity that were evoked after ictal seizures occurred during such period of strong neuronal hyperpolarization. Accordingly, we did not observe any fIPSPs immediately upon termination of ictal seizures, and the transient reversal of Cl⁻ electrochemical gradient and excitatory GABAergic transmission were confined to the period devoid of spontaneous neuronal activity. In line with recent works demonstrating the prolongation of seizures by reversed GABAergic transmission upon the optogenetic activation of PV interneurons but not during spontaneous activity (Magloire *et al.*, 2019), or suggesting a collapse of PV basket cell firing during seizures (Karlócai *et al.*, 2014), our results do not support a strong involvement of spontaneous excitatory perisomatic GABAergic synaptic transmission in post-ictal CA3 circuit activity.

While this reversal of GABAergic polarity is readily seen as a reversed polarity of fIPSPs, we also report a more subtle effect during the course of epileptogenesis in the KA model of chronic epilepsy. One week after KA injection, the majority of pyramidal cells escaped inhibitory control by perisomatic GABAergic events. Besides, we observed that perisomatic GABAergic transmission provided time-locked excitation of pyramidal neurons in the hippocampus, but restricted to a minor subset of neurons, and we did not observe a reversed polarity of fIPSPs. These results suggest that excitatory GABAergic transmission may have a limited contribution to CA3 hippocampal epileptogenesis in contralaterally bicuculline-induced acute seizures or during the latent period in the mouse KA model of epilepsy, as recently suggested in the subicular region during the development of kindling-epilepsy (Wang *et al.*, 2017). Nevertheless, subtle alterations in the regulation of Cl⁻ homeostasis and GABAergic transmission already operate in the hippocampal circuit during the latent period that precedes

the establishment of chronic epilepsy. The functional consequences of defective GABAergic transmission, both in terms of coding and circuit dynamics, and in other periods, other models of epilepsy, and other pathologies, remain to be investigated. Independently of seizure generation, deficient perisomatic inhibition might significantly affect neuronal processing and information coding.

The extracellular detection of perisomatic IPSPs therefore provides an invaluable tool to evaluate Cl⁻ homeostasis and inhibitory function, in physiological conditions and in situations in which alteration or even reversal of GABAergic transmission is hypothesized to occur. This approach opens new possibilities to evaluate the relevance of the excitatory GABA hypothesis in physiological development, autism spectrum disorders, schizophrenia, various forms of epilepsy and the time course of epileptogenesis, as well as to evaluate the potential of pharmacological interference with neuronal Cl⁻ gradient as an effective therapeutic strategy against major brain diseases.

Materials and Methods

Animals. A total of 58 male adult mice (age 5-10 weeks, body weight 30-40g) were used in this study. Animals were kept on a 12h:12h light/dark cycle and provided with ad libitum access to food and water. Among 32 transgenic mice expressing the Cre-recombinase under the control of the Parvalbumin promoter (PV-Cre, Jackson Laboratory, B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J), 27 were injected with Cre-dependant Channelrhodopsin2 (ChR2) for optogenetic activation of PV interneurons with light pulses delivered from a laser source through an optic fiber, among which 15 received an intrahippocampal injection of the convulsive agent kainic acid (Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO), and 5 with the Cre-dependant Pharmacologically Selective Actuator Module fused to the glycine receptor (PSAM-GlyR) for pharmacogenetic silencing of PV-interneurons with the exogenous specific ligand PSEM-89S (Magnus *et al.*, 2011; Sternson and Roth, 2014). Among 26 wild-type mice (B6129SF2), 8 received an intra-hippocampal injection of kainic acid, and the other 18 served as controls. All experimental procedures were performed in accordance with the EU directives regarding the protection of animals used for experimental

and scientific purposes (86/609/EEC and 2010/63/EU), with the French law, and approved by the Ethical committee CEEA50 (saisines #10894, 10896 and 19354).

Surgical procedures. The mice were anesthetized with isoflurane (1.5 - 5%), placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments) and kept on a thermal blanket (Physitemp) to maintain their body temperature at 37.5°C. The eyes were covered with a protective liquid gel (Ocrygel). The scalp and periosteum over the dorsal surface of the skull were removed. **For virus injection** (optogenetic and pharmacogenetic constructions), a small craniotomy was executed at the coordinates of the left dorsal hippocampus (AP-1.6mm and L2.5mm relative to Bregma), and the injections (500nl measured using a Hamilton syringe, 2mm deep from the brain surface) performed (n=32 PV-Cre mice) using a thin glass capillary (40-80µm at the tip). After injection, the capillary was maintained *in situ* for about 10 min before being slowly removed. The scalp was then sutured and the animal housed individually for 3-6 weeks before electrophysiological recording. **For head-restrained experiments** (n=7 PV-Cre mice), reference and ground wires were implanted in the cerebellum and attached to a 2-pin connector, maintained together with a small custom-made horizontal stainless-steel bar anchored to the skull above the cerebellum with dental acrylic. A thin anchoring layer of dental acrylic (Super-Bond, Frapident) was applied on the exposed skull, except at specific locations in which a thin layer of bone was kept intact to allow for dorsal CA3 targeting with the recording silicon probe (left hemisphere, AP-1.6, L2.5, vertical insertion) and optical fiber (AP-1.6, L 3.2, insertion with an angle of 15° from vertical) as well as contralateral (right hemisphere) dorsal hippocampus targeting of the capillary for bicuculline injection (AP-1.6 L1.5, insertion 20° from vertical). **For the study of chronic epileptogenesis** (n=8 WT mice and 15 PV-Cre mice injected with Cre-dependant ChR2), a craniotomy was performed above the dorsal hippocampus (right hemisphere, AP-1.6, L1.5) for vertical insertion of a capillary and injection of kainic acid (0, 2µg dissolved in saline, 500nl measured using a Hamilton syringe) at 1.8 mm from the brain surface. After injection, the capillary was maintained *in situ* for an additional 5 min before being slowly removed. The scalp was then sutured and the animal housed individually for 1 week before electrophysiological recording. As described in previous work (Bouillieret *et al.*, 1999; Riban *et al.*, 2002), 90% of the mice injected with KA experience an initial status epilepticus followed by a latent period (ie without seizures) of about 2 weeks before expressing chronic epilepsy. We can therefore consider that most of the animals we

recorded (n=23 mice) were in a pre-epileptic state. Bicuculline, diazepam and kainic acid were purchased from Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO.

Optogenetic excitation and chemogenetic inhibition of PV interneurons. For **optogenetic** excitation of PV interneurons, PV-Cre mice were injected with an adeno-associated virus (AAV) bearing ChR-2 with a YFP reporter, pAAV-Ef1a-DIO hChR2 (E123T/T159C)-EYFP (gift from Karl Deisseroth, packaged into AAV serotype 9 from Addgene, plasmid # 35509, initial viral titer $\geq 1 \times 10^{13}$ gcp/ml, diluted four times in HBSS). Optogenetic activation (light wavelength 473nm, power max 10-14mW, 2ms pulses, 0.5Hz, driven by a train generator and current stimulator from Digitimer Ltd) was delivered through an optical fiber (diameter 200 μ m) connected to a diode-pumped solid-state (DPSS) laser (Shangai instrument, 100mW or IKECOOL Corporation). For **pharmacogenetic** inhibition of PV interneurons, we used an AAV bearing PSAM-GlyR with a GFP reporter, -rAAV-syn::FLEX-rev::PSAML141F,Y115F:GlyR-IRES-GFP (Addgene, gift from Scott Sternson, plasmid # 32481, packaged into AAV serotype 9, initial viral titer $\geq 10^{13}$ gcp/ml, diluted four times in HBSS). PSAM-GlyR activation was performed by the injection of the specific ligand PSEM-89S (150-200nl, 15 μ M in saline, obtained from Scott Sternson, Janelia Farm Research Campus, VA, USA), pressure-ejected into the left hippocampus from a glass capillary (40-80 μ m at the tip).

Head-restrained recordings. The mice (n=7 PV-Cre), previously implanted with head-posts, were maintained in the stereotaxic apparatus from their implanted fixation bars. Their body was inserted into a plastic tube (diameter approximately 5cm) to provide a reassuring confined environment and prevent excessive body movement. The animals readily habituated to head-fixed conditions. After initial training periods of a few minutes, restraint duration was gradually increased each day until the mouse would sit calmly for a period of roughly 1h. Electrophysiological recordings were performed after several days (at least five) of habituation. The dominant behavioral state in the head-restrained condition was awake immobility. On the day of recording, under brief isoflurane anesthesia (and body temperature control with a heating pad, 37.5°C), the craniotomies were completed and the silicon probe, optical fiber and injection-capillary inserted. After 1h recovery from anesthesia, and baseline recording, bicuculline was

injected (100-200nl, 100 μ M in saline) into the right dorsal hippocampus to induce acute hippocampal seizures. At the end of the recording session, the animals were sacrificed and their brains removed for histological verification of electrode and optical fiber positions. The seizures induced in the head-restrained awake condition are most often not convulsive. In case of convulsion, the animal was immediately anesthetized with isoflurane and the experiment interrupted. This experimental aspect has been specifically submitted and approved by the local ethics committee (EC50) and the final protocol validated by the French Government (saisine #19355).

Multi-site extracellular recording in vivo. Extracellular recordings of spontaneous multi-unit activity and local field potentials were performed on mice either drug free in the head-restrained configuration (n = 7 PV-Cre mice) or anesthetized (n=25 PV-Cre mice and 26 WT mice) with urethane (1.7g/kg, IP) and a complement of ketamine/xylazine (respectively 6.6 and 0.66mg/kg, IM, repeated whenever necessary, usually every 30 to 60min). Animals were fixed in the stereotaxic apparatus (David Kopf instrument), the craniotomy was performed, the dura was gently removed, and a multi-site silicon probe (Neuronexus Technologies, either A1x32-Poly3-5mm-25s-177, 32 channels arranged on a single shank as 3 rows of vertically arranged staggered recording sites, vertical separation 25 μ m, or Buzsaki16, 2 shanks separated by 200 μ m, 8 recording sites each separated by 10-20 μ m), covered with DiI (Molecular Probes) for post-hoc verification of electrode position, was inserted vertically through the neocortex until the pyramidal layer of the CA3a hippocampal region. The stratum pyramidale was recognized by the presence of multiple firing cells and fIPSPs, and confirmed with the post-hoc identification of DiI labeling. Recordings were performed using either Lynx-8 amplifiers (Neuralynx, gain x1000, bandpass filter 0.1Hz to 9KHz) and a digitizer (United Electronics, 14bits, A/D Gain x2, sampling rate 20KHz) controlled by a custom-made LabView (v7.1, National Instruments) program, or an integrated Digital-Lynx SX system (Neuralynx, Cheetah v5.0 software, 24bits, sampling rate 32KHz, bandpass 0.1Hz to 9KHz and range \pm 5mV for LFP analysis, as well as bandpass 1Hz to 9KHz and range \pm 1mV for spike sorting), and stored on a PC for offline analysis. The pyramidal layer was recognized electrophysiologically by the typical presence of fIPSPs and multi-unit firing. The recording started approximately 30 minutes after the insertion of the probe. Urethane was purchased from Sigma-Aldrich, ketamine (Imalgene 1000) from Merial and xylazine (Rompun 2%) from Bayer.

Histological Processing. At the end of the recording session, the animal was transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. Coronal sections (60 μ m-thick, cut using a VT1000S Leica vibratome) were blocked in 5% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0,25% Triton X-100. After Tris-buffered saline washes, sections were incubated overnight at 4°C in 1% BSA, 0,25% Triton X-100 with mouse primary antibody against parvalbumin (1:200, Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO) and rabbit antibody against GFP conjugated to Alexa Fluor 488 (1:2000, Thermo Fisher). After Tris-buffered saline washes, sections were then incubated with 1% BSA, 0,25% Triton X-100 and Alexa Fluor 647 conjugated goat antibody to mouse (1:500, Thermo-Fisher) 4h at room temperature. After Tris-buffered saline washes, sections incubated 10 minutes with DAPI (1:1000 Sigma-Aldrich Co., St Luis, and MO) at room temperature. After washing, sections were mounted and coverslipped on slides. Confocal stack images from the CA3a hippocampal region were acquired. The number of GFP and PV-immunopositive cell bodies was counted on the stacks with the IMARIS software (Oxford instruments). To quantify co-localization, individual GFP labeled interneurons were identified and subsequently scored for PV immunoreactivity. Scans from each sample were collected in 3 slices per animal (n=3 Chr2 injected and 3 PSAM-GlyR injected PV-Cre mice).

Data analysis. Data were visualized and processed using NeuroScope and NDManager from the Neurosuite software (Hazan *et al.*, 2006) (<http://neurosuite.sourceforge.net>), and analyzed using Excel (Microsoft Office 2013), Origin (OriginLab, Northampton, MA) and MATLAB (MathWorks) built-in or custom-built procedures. The spikes were detected and extracted (SpikeDetekt), automatically clustered (KlustaKwik), and the resulting clusters manually verified and refined (KlustaViewa) using the KlustaSuite software (Rossant *et al.*, 2016) (www.cortexlab.net/tools). Beside multi-unit activity (MUA), only the clusters with a clear refractory period and typical bursting pattern of putative pyramidal cells were included in the analysis of neuronal firing (and referred to as pyramidal cells). The fIPSPs were detected with the MiniAnalysis software (6.0.3 Synaptosoft Inc.) from the raw signal using the following parameters: amplitude >100 μ V, rise time 1 to 4-10ms, decay 1-2 to 6-10ms, halfwidth 1-2 to 6-10ms, and decay10-90-slope 25 to 500-1500 μ V/ms. In results, the value taken for rise time is the time to peak (latency from onset to peak) while the decay time constant is the constant value of the exponential curve best fitting the decay of the event. Epileptiform events (inter-

ictal spikes) were identified with Minianalysis as events of positive polarity and larger than 5 times the average amplitude of the detected fIPSPs. All detected events were verified by visual inspection. Peri-event time histograms display the time-distributions of neuronal activity relative to fIPSPs detected from the same electrode/shank. The number of spikes was counted within time-bins of 1ms around reference events (either fIPSP-peak or optogenetic light-stimulation onset), and normalized by the total number of spikes within the histogram. Baseline activity was computed as the mean (and SD) of values between -50 and -30ms. Pyramidal cells were considered as inhibited by fIPSPs if their firing rate decreased and remained below that of [baseline - 2SD] from 0 to at least 4ms after fIPSP-peak. The strength of inhibition was then quantified as the percentage of firing inhibition (relative to baseline) in the inhibitory trough (bin of minimum firing in the 4ms post-fIPSPs), and the duration of recovery as the latency to the last of post-fIPSPs time-bin below [baseline - 2SD]. Only cells with [baseline - 2SD] > 0 were considered to have high and stable enough firing for the possible detection of potential fIPSP-mediated inhibition. Pyramidal cells were considered as excited by fIPSPs if their firing rate increased above [baseline + 3SD] within 4ms after fIPSP-peak. Because bursts of action potentials (short interspike intervals) which first spike would evoke a fIPSP would potentially produce a spurious post-fIPSP peak in the peri-event histogram that may be wrongly interpreted as pyramidal cell excitation, we also computed the peri-event histograms of putatively excited pyramidal cells excluding all the spikes preceded by an action potential by less than 10ms. The post-fIPSP peak-firing was still present in all the tested putatively excited pyramidal cells, excluding the contribution of misinterpretation due to burst firing. Pyramidal cells were considered as non-responding if they were neither inhibited nor excited by fIPSPs. All statistical analyses were performed in Matlab (MathWorks) or Origin (OriginLab). All tests were two-tailed unless otherwise indicated. Our data did not follow normal distributions, therefore the non-parametric Wilcoxon Mann-Whitney test was used. Results are displayed as mean \pm s.e.m. unless indicated otherwise.

Acknowledgements. We thank Roustem Khazipov, Rosa Cossart, Valérie Crepel, Tarek Deeb and Isabel Del Pino for useful comments and discussions on a previous version of the manuscript, Delphine Gonzales, Nathalie Aubailly, and all the personnel of the Animal Facility of the NeuroCentre Magendie for animal care, Katy Lecorff for her help regarding virus

preparation, the UMR5293 vector core facility for producing AAV vectors, and the laboratory of S.M. Sternson (Howard Hughes Medical Institute) for providing the chemical compound PSEM-89S.

Funding. This work was performed thanks to the following funding sources: INSERM, CNRS (XL), Région Nouvelle Aquitaine (XL, AB), the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS, XL, HH), the Brain and Behavior Research Foundation (AB), Agence Nationale pour la Recherche (ANR, XL), the Fondation Française pour la Recherche sur les Epilepsies (FFRE, XL), the French Ministry of Research and Education (OD). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

Author contributions. XL and HH performed pilot experiments and initiated the study. XL conceived and designed the experiments. OD and XL planned the study. OD, A. Ferreira, AB and XL performed the experiments. OD and XL analyzed the data. A. Frick contributed with lab and breeding space, and a fraction of running expenses. OD, AB and XL wrote the paper.

Data availability. The data shown in the paper will be made available upon reasonable request to the corresponding author.

Code availability. The custom code used for analysis will be made available upon reasonable request to the corresponding author.

References

- Assaf F, Schiller Y. The antiepileptic and ictogenic effects of optogenetic neurostimulation of PV-expressing interneurons. *Journal of Neurophysiology* 2016; 116(4): 1694-704.
- Astorga G, Bao J, Marty A, Augustine GJ, Franconville R, Jalil A, *et al.* An excitatory GABA loop operating in vivo. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015; 9(275).
- Barmashenko G, Hefft S, Aertsen A, Kirschstein T, Köhling R. Positive shifts of the GABA_A receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia* 2011; 52(9): 1570-8.
- Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I, Miles R. Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *J Physiol* 2010; 588(Pt 12): 2077-90.
- Ben-Ari Y. NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends in Neurosciences* 2017; 40(9): 536-54.
- Beyeler A, Retailleau A, Molter C, Mehidi A, Szabadics J, Leinekugel X. Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity. *PLoSOne* 2013; 8(6): e66509.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. *Neuron* 2009; 61(6): 820-38.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal LS. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1999; 89(3): 717-29.
- Bragin DE, Sanderson JL, Peterson S, Connor JA, Müller WS. Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. *European Journal of Neuroscience* 2009; 30(4): 611-24.
- Brandt C, Nozadze M, Heuchert N, Rattka M, Löscher W. Disease-Modifying Effects of Phenobarbital and the NKCC1 Inhibitor Bumetanide in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30(25): 8602-12.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 1994; 71(4): 1289-307.
- Cellot G, Cherubini E. GABAergic Signaling as Therapeutic Target for Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Pediatrics* 2014; 2(70).
- Chang M, Dian JA, Dufour S, Wang L, Moradi Chameh H, Ramani M, *et al.* Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. *Neurobiology of Disease* 2018; 109: 102-16.
- Chavas J, Forero ME, Collin T, Llano I, Marty A. Osmotic tension as a possible link between GABA(A) receptor activation and intracellular calcium elevation. *Neuron* 2004; 44(4): 701-13.
- Chavas J, Marty A. Coexistence of Excitatory and Inhibitory GABA Synapses in the Cerebellar Interneuron Network. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(6): 2019-31.

Chen L, Wan L, Wu Z, Ren W, Huang Y, Qian B, *et al.* KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 156.

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 1995; 378(6552): 75-8.

Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the Origin of Interictal Activity in Human Temporal Lobe Epilepsy in Vitro. *Science* 2002; 298(5597): 1418-21.

Deidda G, Parrini M, Naskar S, Bozarth IF, Contestabile A, Cancedda L. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nature Medicine* 2015; 21(4): 318-26.

Di Cristo G, Awad PN, Hamidi S, Avoli M. KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Progress in Neurobiology* 2018; 162: 1-16.

Donovan MD, Schellekens H, Boylan GB, Cryan JF, Griffin BT. In vitro bidirectional permeability studies identify pharmacokinetic limitations of NKCC1 inhibitor bumetanide. *European Journal of Pharmacology* 2016; 770: 117-25.

Doyon N, Vinay L, Prescott Steven A, De Koninck Y. Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. *Neuron* 2016; 89(6): 1157-72.

Dzhala V, Valeeva G, Glykys J, Khazipov R, Staley K. Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain. *JNeurosci* 2012; 32(12): 4017-31.

Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, *et al.* NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature Medicine* 2005; 11: 1205.

Ellender TJ, Raimondo JV, Irkle A, Lamsa KP, Akerman CJ. Excitatory Effects of Parvalbumin-Expressing Interneurons Maintain Hippocampal Epileptiform Activity via Synchronous Afterdischarges. *The Journal of Neuroscience* 2014; 34(46): 15208-22.

French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, *et al.* Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Annals of Neurology* 1993; 34(6): 774-80.

Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FE, Bannerman DM, *et al.* Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron* 2007; 53(4): 591-604.

Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Nambu A, Takada M. Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 2003; 119(1): 265-75.

Glickfeld LL, Roberts JD, Somogyi P, Scanziani M. Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. *Nature Neuroscience* 2009; 12(1): 21-3.

Glykys J, Dzhala V, Egawa K, Balena T, Saponjian Y, Kuchibhotla KV, *et al.* Local Impermeant Anions Establish the Neuronal Chloride Concentration. *Science* 2014; 343(6171): 670-5.

Goutierre M, Al Awabdh S, Donneger F, François E, Gomez-Dominguez D, Irinopoulou T, *et al.* KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. *Cell reports* 2019; 28(1): 91-103.e7.

Gulledge AT, Stuart GJ. Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 2003; 37(2): 299-309.

Hazan L, Zugaro M, Buzsaki G. Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience methods* 2006; 155(2): 207-16.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, *et al.* Perturbed Chloride Homeostasis and GABAergic Signaling in Human Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 2007; 27(37): 9866-73.

Kahle KT, Staley KJ. The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. *Neurosurgical Focus* 2008; 25(3): E22.

Karlócai MR, Kohus Z, Káli S, Ulbert I, Szabó G, Máté Z, *et al.* Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? *Brain* 2014; 137(2): 463-85.

Khalilov I, Minlebaev M, Mukhtarov M, Khazipov R. Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 2015; 35(37): 12635-42.

Kirmse K, Kummer M, Kovalchuk Y, Witte OW, Garaschuk O, Holthoff K. GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nature Communications* 2015; 6: 7750.

Kourdougli N, Pellegrino C, Renko JM, Khirug S, Chazal G, Kukko-Lukjanov TK, *et al.* Depolarizing γ -aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Annals of Neurology* 2017; 81(2): 251-65.

Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nature Communications* 2013; 4: 1376.

Lopez-Pigozzi D, Laurent F, Brotons-Mas JR, Valderrama M, Valero M, Fernandez-Lamo I, *et al.* Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta–Gamma Rhythmpathies of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro* 2016; 3(6): ENEURO.0284-16.2016.

Löscher W, Puskarjov M, Kaila K. Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* 2013; 69: 62-74.

Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, *et al.* Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *NatNeurosci* 2012; 15(3): 423-.

Lu T, Trussell LO. Mixed excitatory and inhibitory GABA-mediated transmission in chick cochlear nucleus. *J Physiol* 2001; 535(Pt 1): 125-31.

MacKenzie G, O'Toole KK, Moss SJ, Maguire J. Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy. *Epilepsy Research* 2016; 126: 185-96.

Magloire V, Cornford J, Lieb A, Kullmann DM, Pavlov I. KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nature Communications* 2019; 10(1): 1225.

Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM. Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* 2011; 333(6047): 1292-6.

Marguet SL, Le-Schulte VTQ, Merseburg A, Neu A, Eichler R, Jakovcevski I, *et al.* Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nature Medicine* 2015; 21(12): 1436-44.

Menendez de la Prida L, Trevelyan AJ. Cellular mechanisms of high frequency oscillations in epilepsy: On the diverse sources of pathological activities. *Epilepsy Research* 2011; 97(3): 308-17.

Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996; 16: 815-23.

Minlebaev M, Valeeva G, Tcheremiskine V, Coustillier G, Khazipov R. Cell-attached recordings of responses evoked by photorelease of GABA in the immature cortical neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2013; 7(83).

Moore YE, Kelley MR, Brandon NJ, Deeb TZ, Moss SJ. Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy. *Trends in Neurosciences* 2017; 40(9): 555-71.

Nardou R, Yamamoto S, Chazal G, Bhar A, Ferrand N, Dulac O, *et al.* Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. *Brain* 2011; 134(4): 987-1002.

Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, *et al.* Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Science Translational Medicine* 2014; 6(244): 244ra89-ra89.

Pathak HR, Weissinger F, Terunuma M, Carlson GC, Hsu F-C, Moss SJ, *et al.* Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 2007; 27(51): 14012-22.

Puskarjov M, Kahle KT, Ruusuvuori E, Kaila K. Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. *Epilepsia* 2014; 55(6): 806-18.

Racz A, Ponomarenko AA, Fuchs EC, Monyer H. Augmented hippocampal ripple oscillations in mice with reduced fast excitation onto parvalbumin-positive cells. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29(8): 2563-8.

Riban V, Boullieret V, Pham-Lê BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2002; 112(1): 101-11.

Rieki R, Pavlov I, Tornberg J, Lauri SE, Airaksinen MS, Taira T. Altered Synaptic Dynamics and Hippocampal Excitability but Normal Long-Term Plasticity in Mice Lacking Hyperpolarizing GABAA Receptor-Mediated Inhibition in CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 2008; 99(6): 3075-89.

Römermann K, Fedrowitz M, Hampel P, Kaczmarek E, Töllner K, Erker T, *et al.* Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. *Neuropharmacology* 2017; 117: 182-94.

Rossant C, Kadir SN, Goodman DFM, Schulman J, Hunter MLD, Saleem AB, *et al.* Spike sorting for large, dense electrode arrays. *Nat Neurosci* 2016; 19(4): 634-41.

Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15(10): 6651-65.

Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 2005; 562(Pt 1): 9-26.

Staley KJ, Mody I. Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *Journal of Neurophysiology* 1992; 68: 197-212.

- Sternson SM, Roth BL. Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Functions. *Annual Review of Neuroscience* 2014; 37(1): 387-407.
- Töpfer M, Töllner K, Brandt C, Twele F, Bröer S, Löscher W. Consequences of inhibition of bumetanide metabolism in rodents on brain penetration and effects of bumetanide in chronic models of epilepsy. *European Journal of Neuroscience* 2014; 39(4): 673-87.
- Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, *et al.* Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 2008; 27(10): 2515-28.
- Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, *et al.* Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* 2014; 343(6171): 675-9.
- Valeeva G, Tressard T, Mukhtarov M, Baude A, Khazipov R. An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2016; 36(22): 5961-73.
- Valero M, Averkin RG, Fernandez-Lamo I, Aguilar J, Lopez-Pigozzi D, Brotons-Mas JR, *et al.* Mechanisms for Selective Single-Cell Reactivation during Offline Sharp-Wave Ripples and Their Distortion by Fast Ripples. *Neuron* 2017; 94(6): 1234-47.e7.
- van der Pol AN, Obrietan K, Chen G. Excitatory Actions of GABA after Neuronal Trauma. *The Journal of Neuroscience* 1996; 16: 4283-92.
- Wang Y, Xu C, Xu Z, Ji C, Liang J, Wang Y, *et al.* Depolarized GABAergic Signaling in Subicular Microcircuits Mediates Generalized Seizure in Temporal Lobe Epilepsy. *Neuron* 2017; 95(1): 92-105.e5.

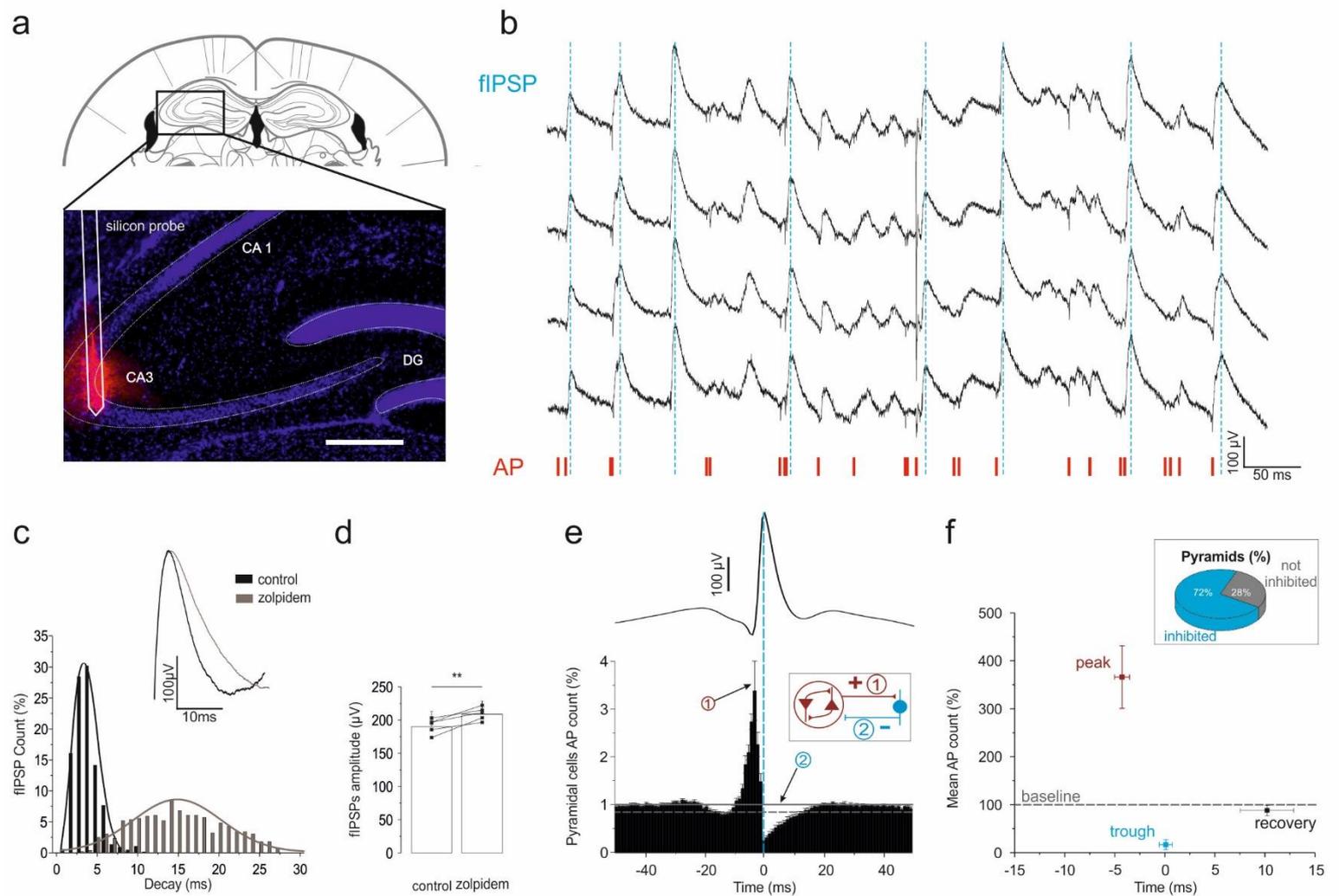


Figure 1: Spontaneous extracellular field inhibitory post-synaptic potentials (fIPSPs) in vivo

(a) Schematic of electrode track and histological verification of recording location within the CA3 hippocampal region (**DiI-labeled silicon probe in red, DAPI staining in blue**).

(b) Example trace of spontaneous wide-band (0.1Hz-9KHz) field-recording activity in the CA3 pyramidal layer, displaying 4 channels (10-20 μ m distance between recording sites) of the same shank of a 2-shanks Neuronex Buzsaki16 silicon probe. Field-events of positive polarity (upward deflections), fIPSPs (peaks, **dashed blue lines**). Fast downward deflections, action potentials (AP), also labeled below as raster display (**red ticks**, multi-unit activity). Note the transient interruption of neuronal firing after fIPSPs.

(c) Comparison of fIPSP decay (Top, superimposed average traces normalized on amplitude, bottom, histogram distribution of fIPSPs decay times in control (black) and in presence of zolpidem (brown). Note prolonged fIPSP decay under zolpidem.

(d) Summary plots (mean \pm SD, n=5 mice) of fIPSP amplitude in control (baseline) and in presence of zolpidem (** p<0.01).

(e) Peri-event time histogram (mean and SEM, n=18 WT mice, time bin 1ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells and fIPSPs (reference, peak-time), shown as average trace on top at the same time scale and aligned on peak (**dotted blue line**). Baseline mean and 2SD are respectively shown as **plain and dotted horizontal grey lines**. Note increased pyramidal cell discharge in the 10 ms prior to fIPSP, and the strong inhibition (trough, max inhibition) that follows. **Inset**, schematic illustration of the recurrent excitatory/inhibitory loop: **(1)** the collective discharge of interconnected pyramidal cells activates the discharge of local interneurons, resulting **(2)** in perisomatic fIPSP and inhibition of pyramidal population activity.

(f) Diagram illustrating firing rates (mean \pm SD, same 18 mice as in D; baseline level = 100%, calculated from -50 to -30ms) at **peak** (bin of maximum firing in the 10ms prior to fIPSPs), **trough** (bin of minimum firing in the 4ms post-fIPSPs), and **recovery** (last of post-fIPSPs time bin below baseline - 2SD) time points. **Inset**, proportion of pyramidal cells (n=18 mice, for a total of 389 cells) with a significant post-fIPSPs trough (ie inhibited vs not-inhibited neurons).

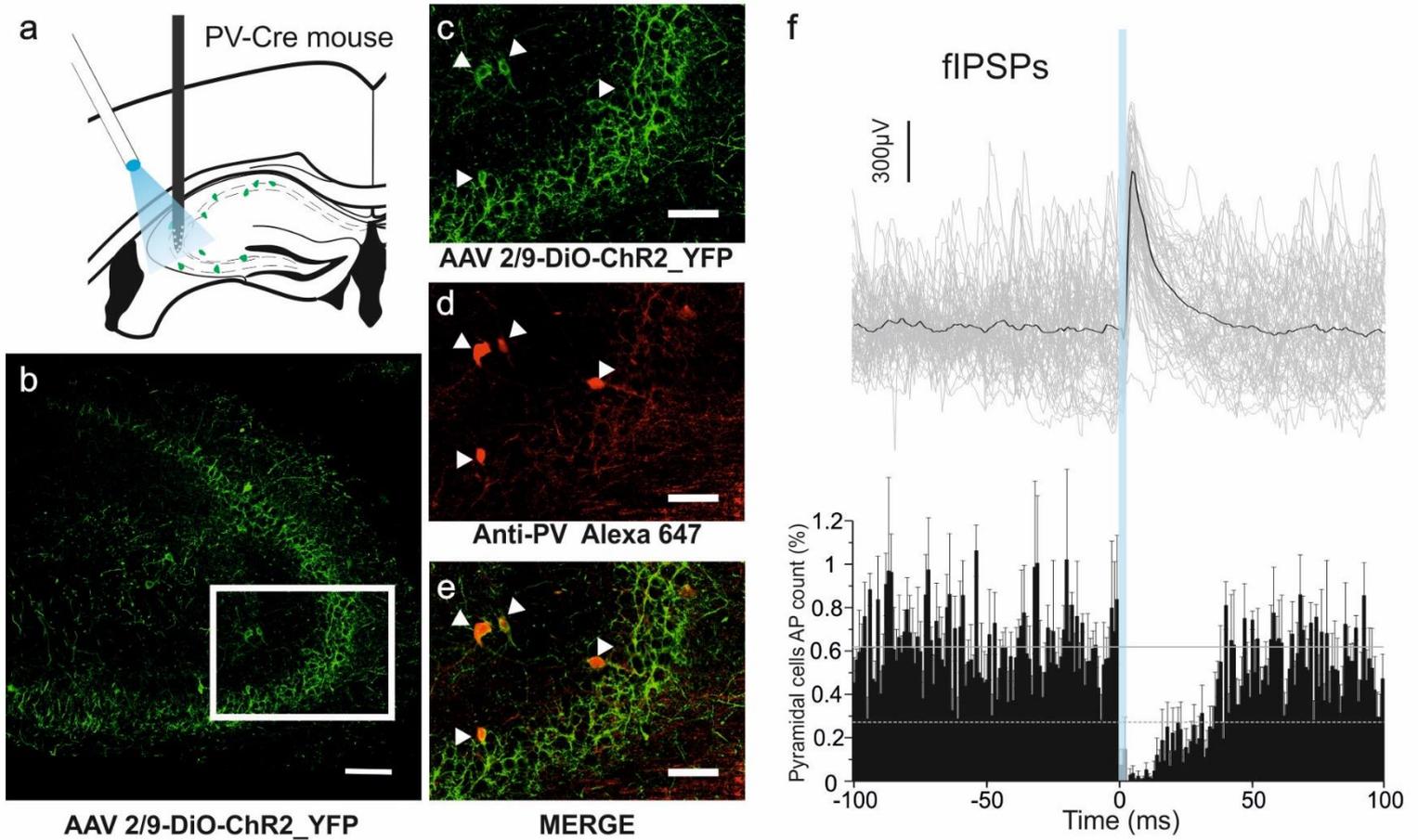


Figure 2: In vivo fIPSPs generated by optogenetic activation of PV interneurons

(a) Schematic representation of electrode and optic fiber positions in PV-Cre mice with AAV-driven ChR2 and E-YFP expression in CA3 PV interneurons.

(b-e) Confocal stacks of E-YFP -positive (**green**) and PV-positive (**red**) immunostaining in the hippocampal CA3 region. **(b, scale bar, 100 μ m)** E-YFP immunostaining. **(c-e, scale bar, 50 μ m)**, higher magnification of the CA3a region delimited by the **white rectangle** in B). **(c)** E-YFP immunostaining. **(d)** PV immunostaining. **(e)** Overlay. Note the co-localization on the 4 identified PV interneurons (arrow-heads).

(f) Peri-event time histogram (mean \pm SEM, $n=5$ mice, time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells and optogenetically evoked (laser ON 2ms, **blue bar**) fIPSPs (reference), shown as superimposed (**grey**) and average (**black**) traces ($n=60$ from a single representative recording) on top, aligned and at the same time scale. Note the powerful time-locked inhibition of pyramidal cell firing in response to

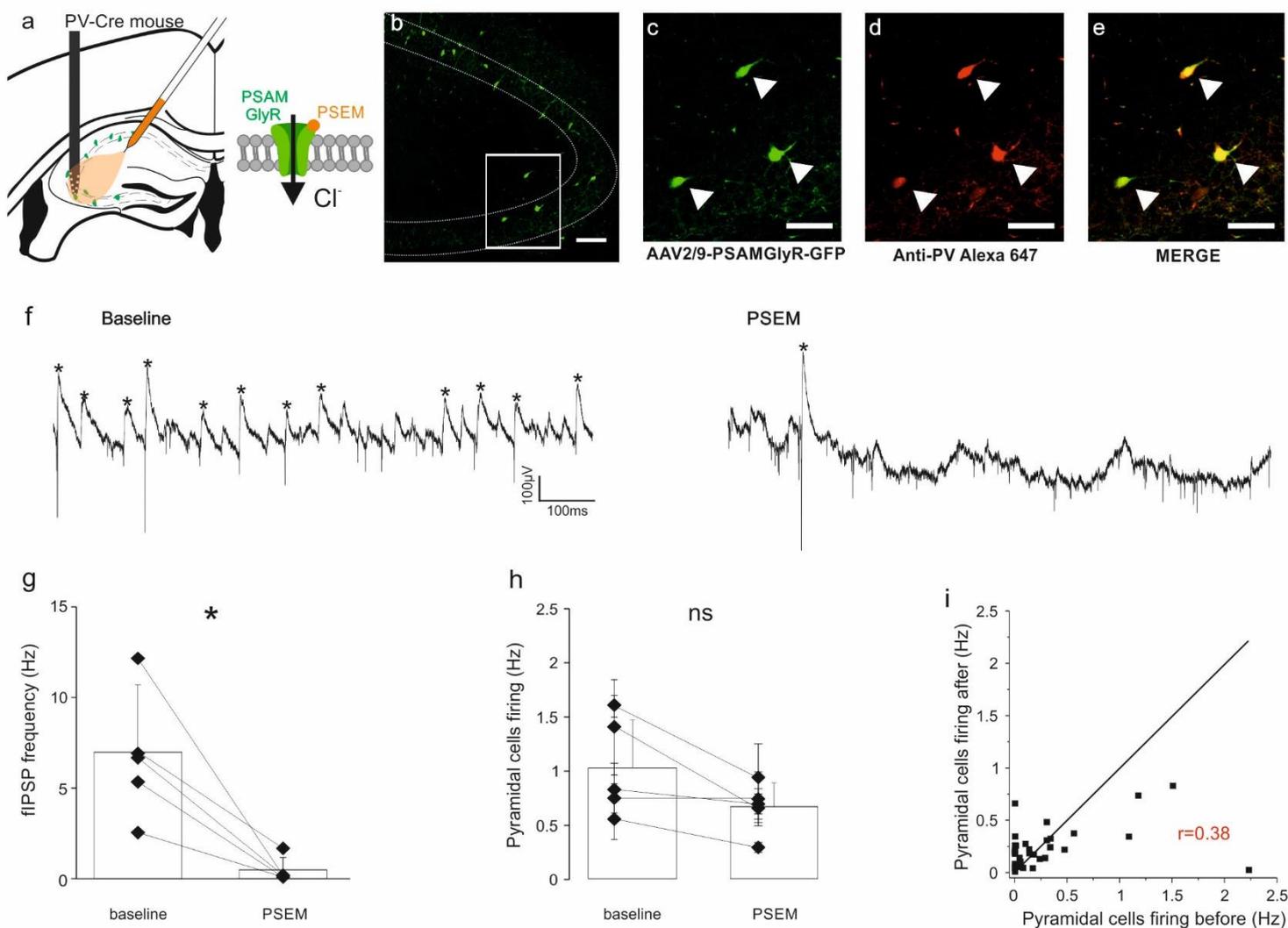


Figure 3: Inhibition of fIPSPs by pharmacogenetic inactivation of PV interneurons

(a) Schematic representation of electrode and injection site in PV-Cre mice with AAV-driven PSAM-GlyR and GFP expression in CA3 PV interneurons.

(b-e) Confocal stacks of GFP-positive (green) and PV-positive (red) immunostaining in the hippocampal CA3 region. (b, scale bar, 100µm) GFP immuno staining. (c-e, scale bar, 50µm), higher magnification of the CA3a region delimited by the white rectangle in B). (c) GFP immuno-staining. (d) PV immunostaining. (e) Overlay. Note the co-localization of PV and PSAM-GlyR immuno-staining on the 3 labeled interneurons (arrow-heads).

(f) Example traces of spontaneous wide-band (0.1Hz-9KHz) field-recording activity in the CA3 pyramidal layer, in control (left, baseline) and in presence of the exogenous ligand PSEM-89S (right, PSEM). Note the drastic reduction in fIPSPs expression (*).

(g-h) Summary plots (mean ± SD, n=5 mice) of fIPSP frequency (g) and pyramidal population firing rate (h) in control (baseline) and in presence of PSEM (* p<0.05).

(i) Individual pyramidal cells firing rates (n=36 putative pyramidal cells from 3 mice) in control ("before" is the 10min period that immediately precedes PSEM-89S injection) and in presence of PSEM ("after" period is from 5 to 15min after PSEM-89S injection). Black line, bissector (y=x). Red line, linear regression line. Note that the pharmacogenetic blockade of PV interneurons with PSAM-GlyR redistributed individual firing rates without any significant change on global population firing activity.

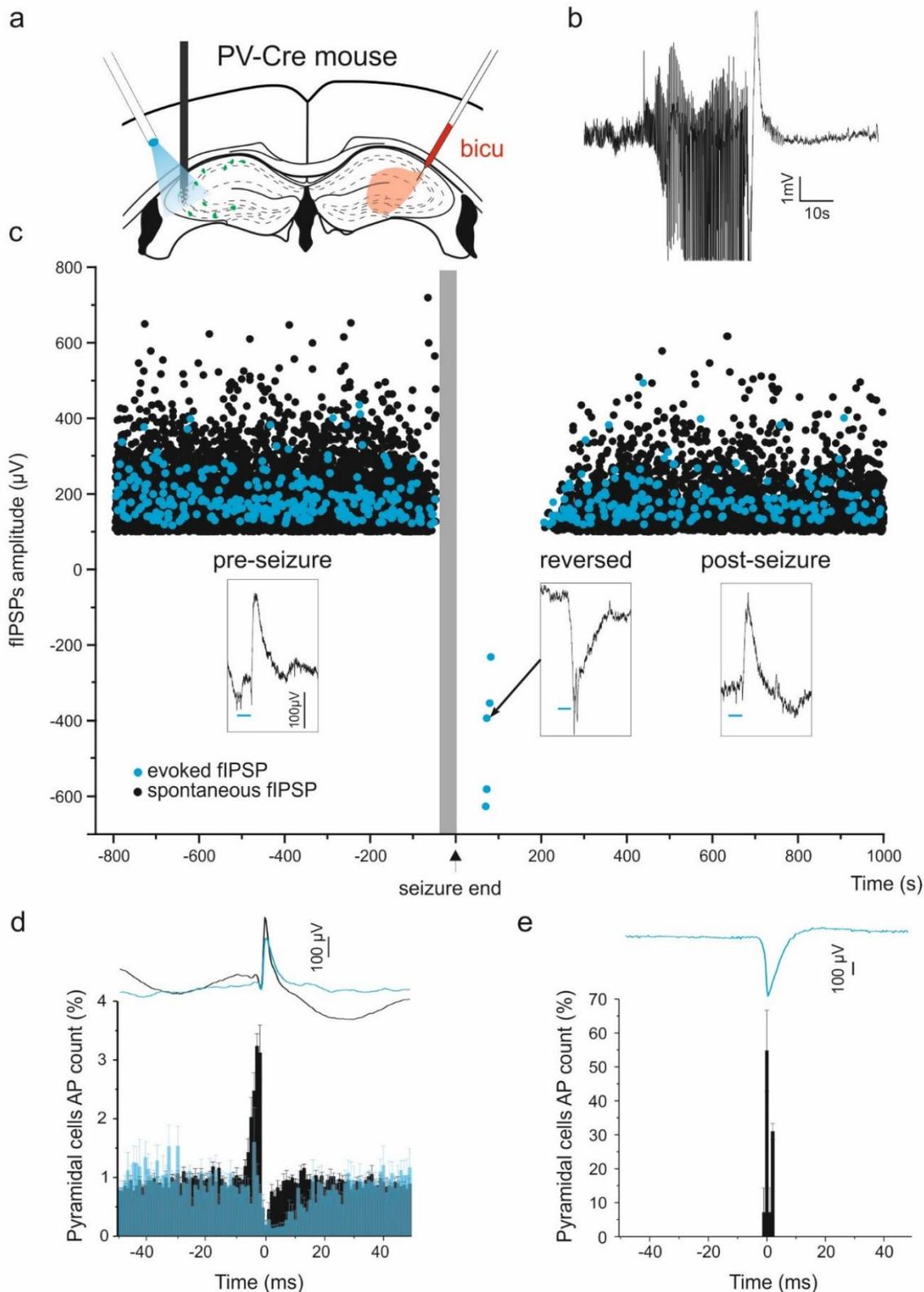


Figure 4: Transiently reversed fIPSPs and perisomatic GABAergic synaptic transmission following acute seizures

(a) Schematic representation of electrode and optic fiber positions in the left hippocampus of PV-Cre mice with AAV-driven ChR2 expression in CA3 PV interneurons, and contralateral injection of the convulsivant bicuculline.

(b) Example trace (wide-band LFP) of a seizure as acute response to contralateral bicuculline injection.

(c) Time course of individual fIPSPs amplitude (**black dots**, spontaneous, **blue dots**, evoked by optogenetic activation of PV interneurons), relative to acute seizures induced by the contralateral injection of bicuculline (**vertical grey bar**, 3 seizures from the same animal, aligned by their ending time). **Insets**, representative individual field responses (optogenetically evoked fIPSPs; **horizontal blue bars**, laser ON) in control (**pre-seizure**), during the period right after the seizure (**reversed polarity**), or after recovery (**post-seizure**). Note transiently evoked spiking activity induced by fIPSPs of reversed polarity right after the seizure and progressive recovery of fIPSPs amplitude.

(d) Peri-event time histogram (mean and SEM, time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells ($n=7$ mice) and spontaneous (in **black**, $n=44435$ events) or optogenetically evoked (in **blue**, $n=7738$ events) fIPSPs (reference) from the pre- and post-seizure periods, shown as average traces on top (spontaneous, **black**; evoked, **blue**) at the same time scale and aligned on peak.

(e) Peri-event time histogram (mean and SEM, time bin 1 ms) between firing activity ($n=3$ responding neurons from 2 mice out of 42 putative pyramidal cells from 7 mice) and optogenetically evoked fIPSPs (reference) in the period right after the seizure ($n=18$ fIPSPs from 4 seizures with excited putative pyramidal cells, out of a total of 14 seizures), shown as average traces on top at the same time scale and aligned on peak. Note the clear time-locked excitation of pyramidal cell firing and reversed polarity of the fIPSPs evoked by the optogenetic stimulation of PV interneurons in the period right after the seizure.

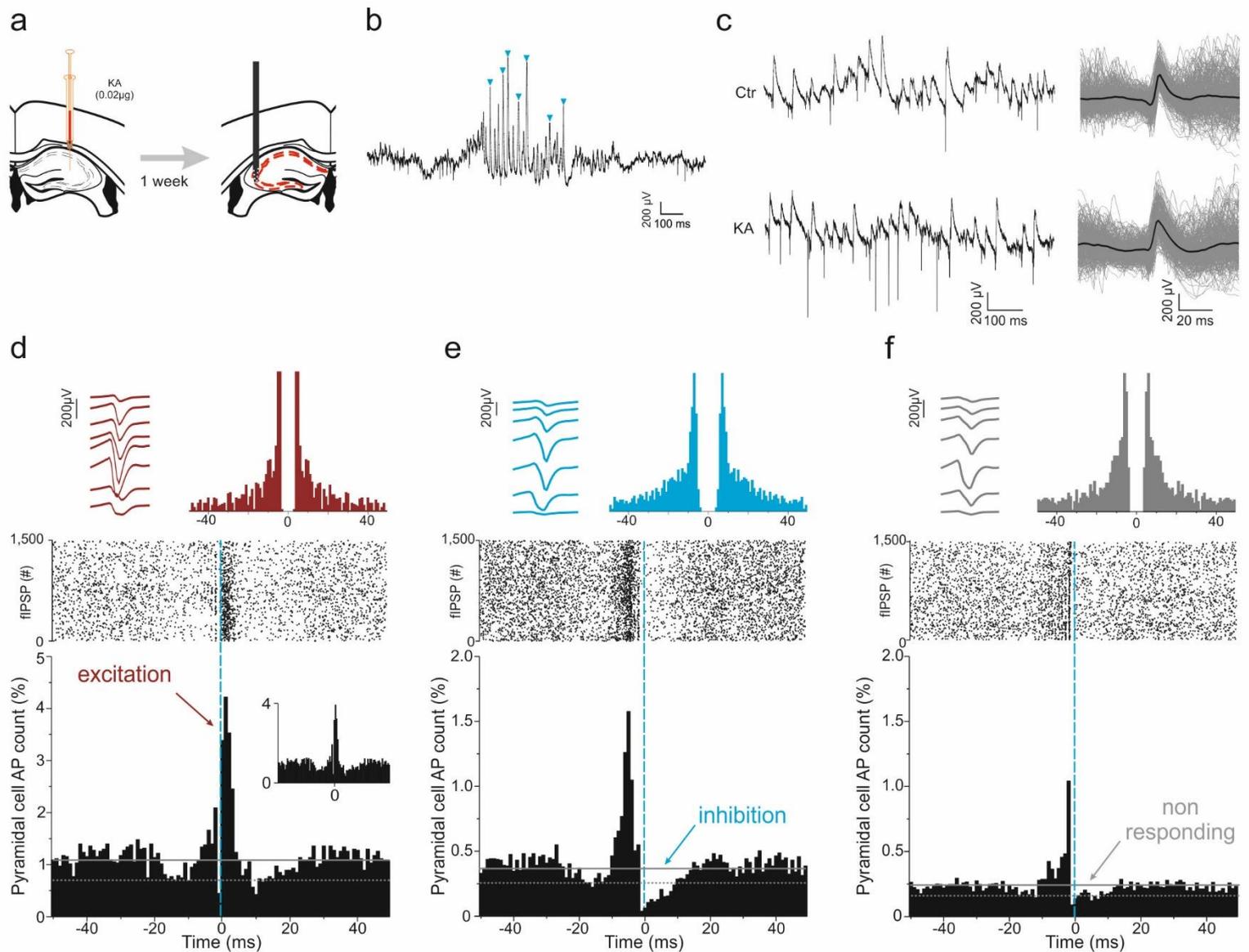


Figure 5: Normal fIPSP polarity but GABA-mediated time-locked excitation in head-fixed KA-treated mice
(a) CA3 neuronal activity was recorded from urethane-anesthetized WT mice one week after contralateral, intra-hippocampal KA injection.
(b) Example trace (wide-band LFP) of interictal burst (interictal spikes, **blue arrow-heads**).
(c) Example traces of spontaneous CA3 pyramidal layer activity (left) and superimposed (grey) and averaged (black) traces of fIPSPs (right), in control (top) and KA (below) conditions. Note the presence of normal polarity, frequent fIPSPs, in both conditions.
(d-f) Individual examples of putative pyramidal cells displaying the three distinct types of observed responses to spontaneous fIPSPs in KA-treated mice (time locked excitation **(d)**, time-locked inhibition **(e)**, or no clear change in net firing rate **(f, non responding)**). **Upper left**, average waveform from the 8 channels of the recording electrode. **Upper right**, spike autocorrelogram. **Middle**, raster display of spike firing aligned on fIPSP occurrence (**vertical blue line**, fIPSP peak). **Lower plot**, normalized peri-event time histogram (time bin, 1ms) of the neuron discharge (AP count) relative to fIPSP peak (reference, **vertical blue line**). **Inset (d)**, similar peri-event time histogram but ignoring action potential bursts (ie all spikes with preceding inter spike interval < 10ms omitted from the histogram).

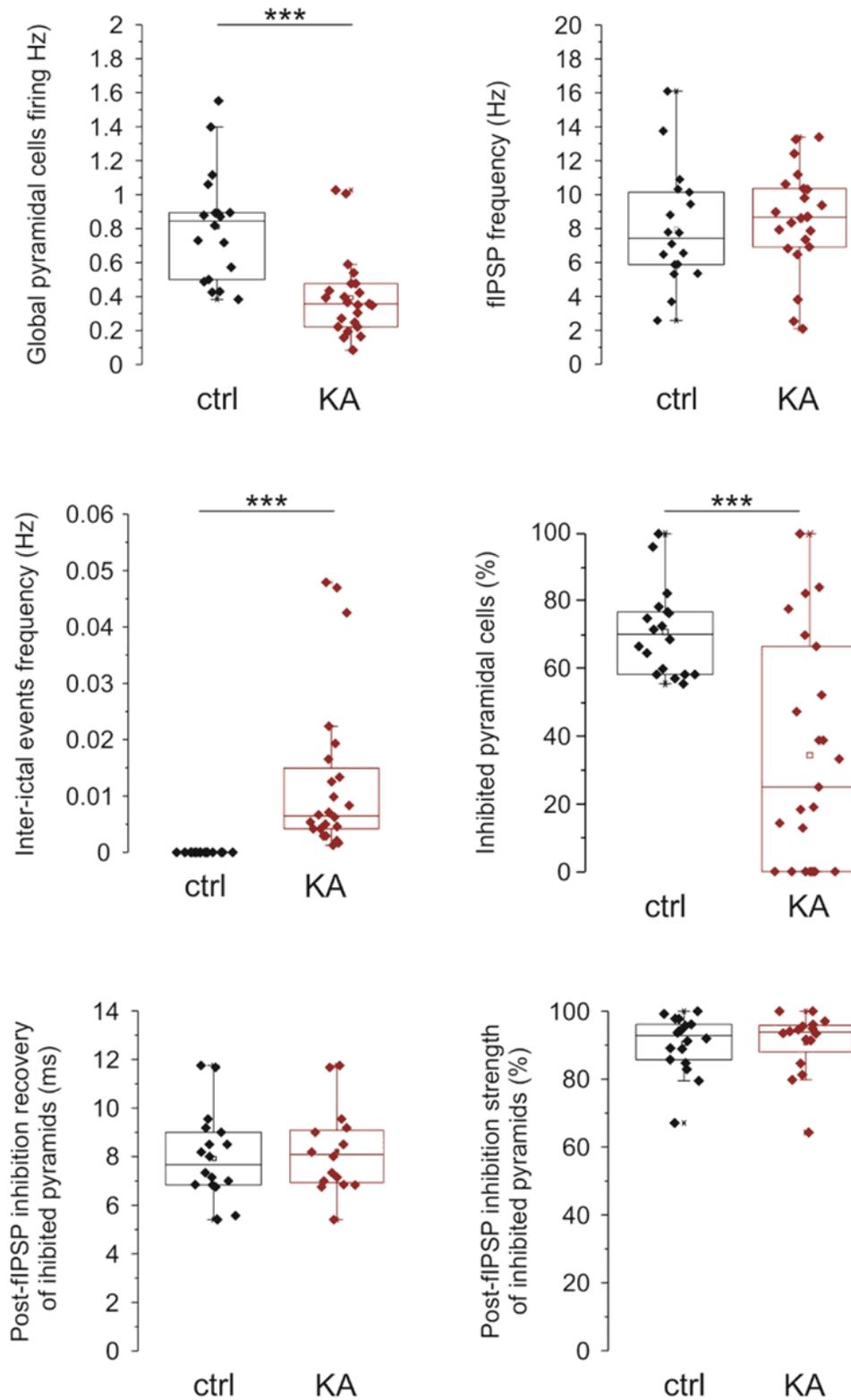
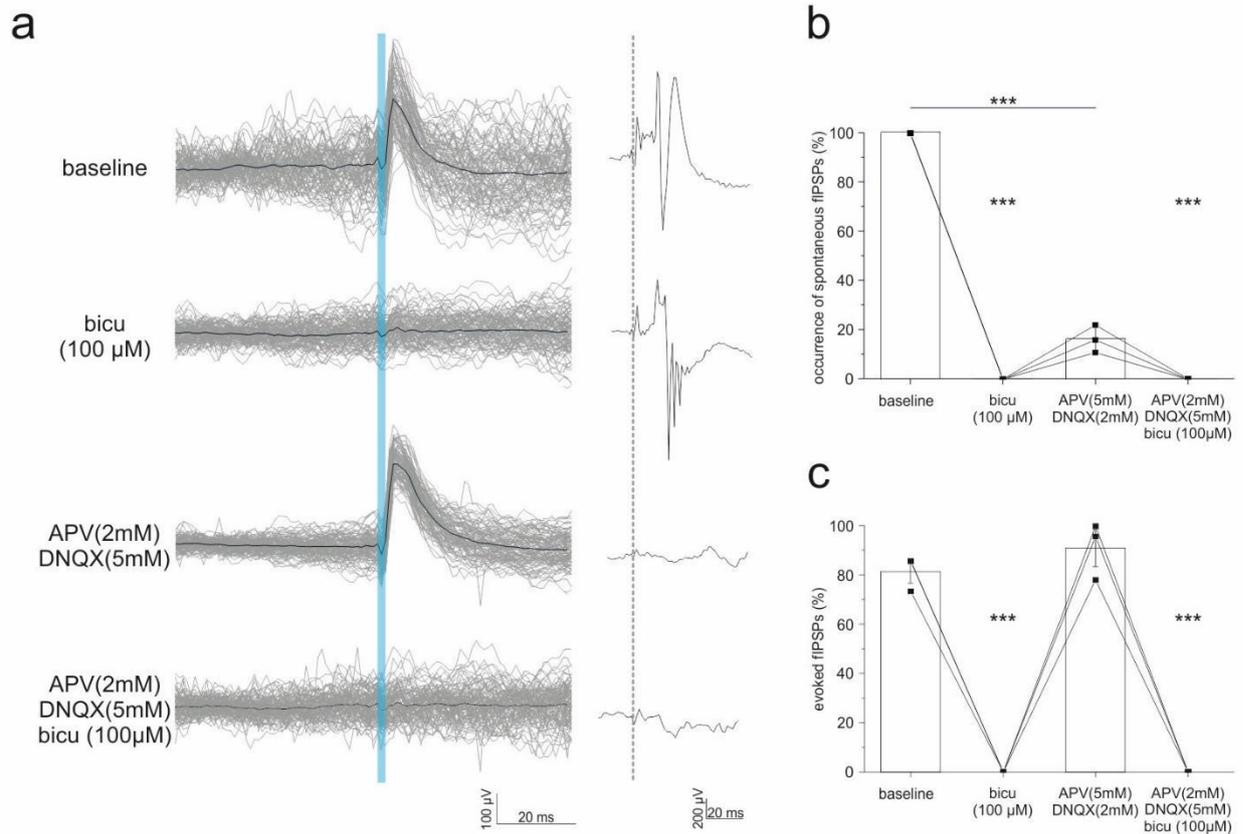


Figure 6: Altered perisomatic inhibition in a minority of pyramidal cells during the latent, pre-epileptic period

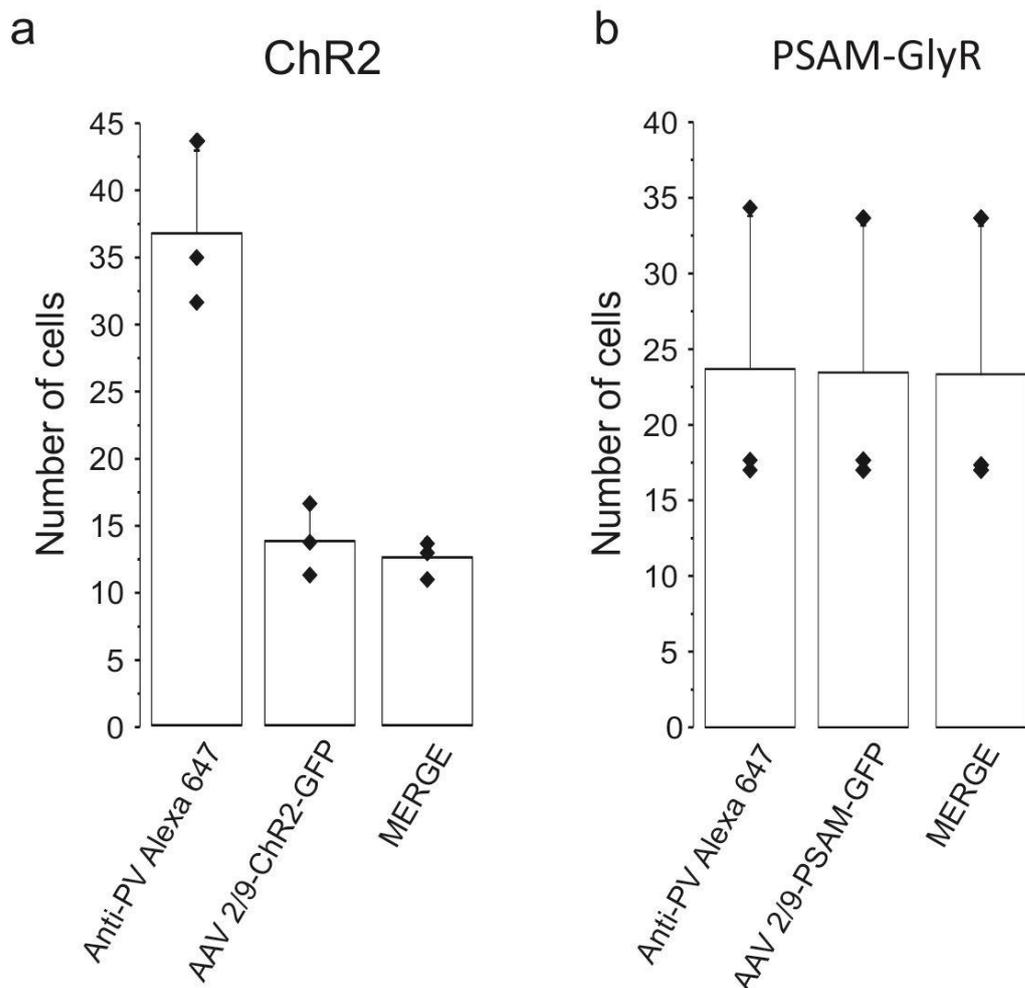
Distribution of individual animals based on their proportion of putative pyramidal cells displaying either of the three distinct types of observed responses to spontaneous fIPSPs (time-locked inhibition (a), no clear change in net firing rate (b), non responding) or time locked excitation (c)). These results suggest heterogeneous alterations of GABAergic transmission and the potential presence of two distinct groups among KA-treated mice (diamond symbols, individual animals): KA1 (red diamonds) with more than 50% of putative pyramidal cells not inhibited (ie either non responding or excited) by spontaneous fIPSPs, KA2 (grey diamonds) with more than 50% of inhibited putative pyramidal cells, as in control animals (Ctr, black diamonds).



Supplementary Figure 1: Spontaneous and evoked fIPSPs are abolished by bicuculline but not by APV/DNQX

(a) On the left, superimposed (**grey**) and average (**black**) traces of evoked fIPSPs (laser ON 2ms **blue bar**; n=50 from a single representation recording) in control and in presence of bicuculline, APV/DNQX and APV/DNQX+bicuculline with on the right, the corresponding glutamatergic LFP response evoked by contralateral electrical stimulation of CA3 inputs.

(b) Summary plot (mean \pm SD, n=3 mice) of spontaneous (**top**) and evoked (**bottom**) fIPSP in control (baseline) and in presence of bicuculline, APV/DNQX and APV/DNQX+bicuculline (***) p<0.001).



Supplementary Figure 2: Immuno-histological control of ChR2 and PSAM-GlyR expression in PV interneurons

(a) Summary plot (mean \pm SD, n=3 mice) of the number of cells immuno-positive for PV (anti-PV Alexa 647), for ChR2-GFP, and for both (merge). Note that only a fraction of PV cells express ChR2 but that virtually all cells expressing ChR2 are PV cells, indicative of high specificity of ChR2 expression for PV cells.

(b) Summary plot (mean \pm SD, n=3 mice) of the number of cells immuno-positive for PV (anti-PV Alexa 647), for PSAM-GlyR-GFP, and for both (merge). Note that almost all PV cells also express PSAM-GlyR and that virtually all cells expressing PSAM-GlyR are PV cells, indicating high specificity and high coverage of infection for PV cells.

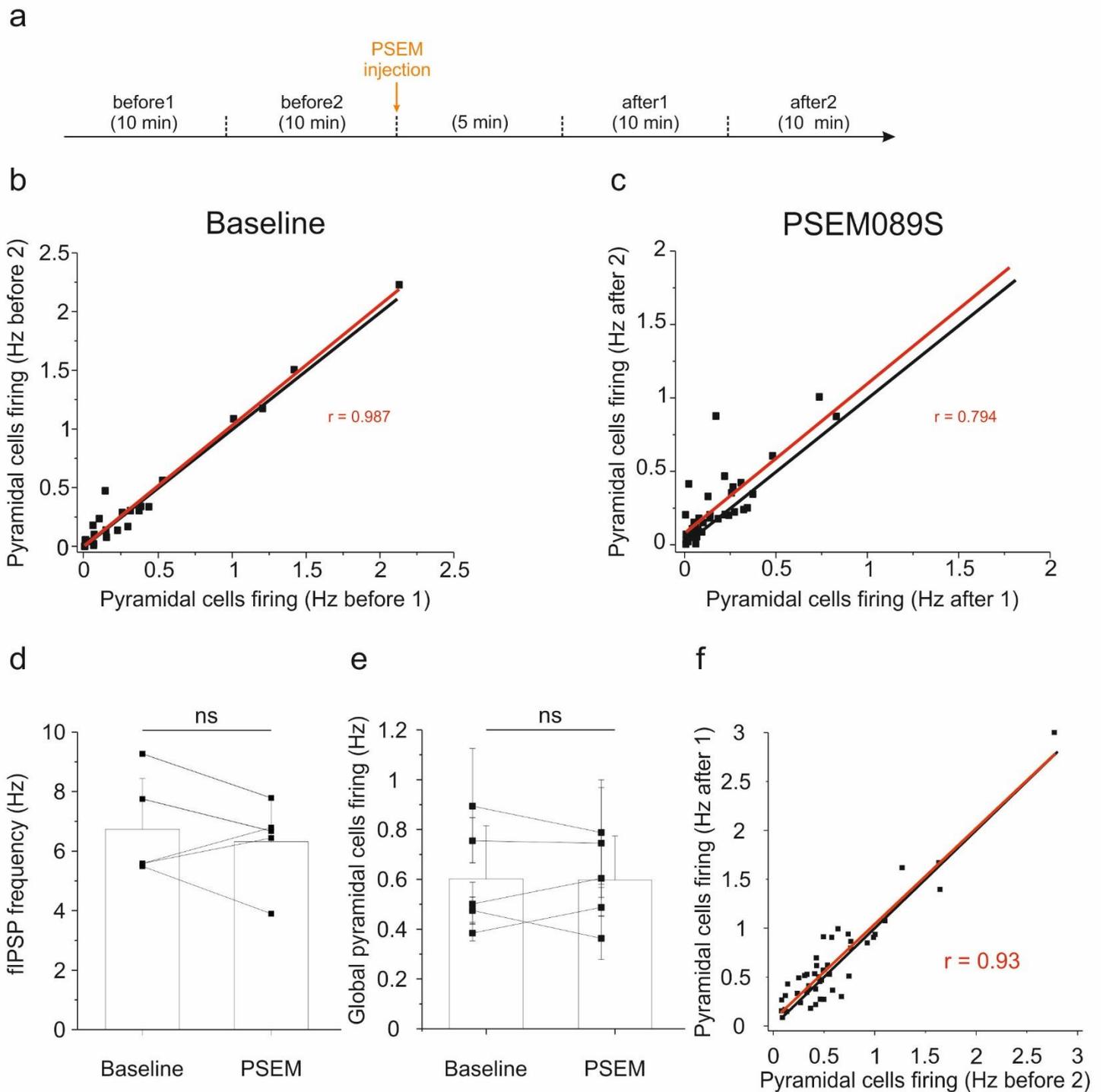


Figure S3: Redistribution of pyramidal cells firing rates after pharmacogenetic blockade of PV interneurons

Comparison of discharge frequency of individual pyramidal cells ($n = 42$ neurons from 5 mice) in two successive recordings of 10min, either both before (**b**), **baseline** or both after (**c**), **PSEM-89S** the injection of PSEM-89S, as depicted in (**a**). Note high correlation values (r) in both baseline and PSEM-89S, indicating stable activity among CA3 pyramidal cells. (**d-e**) Summary plots (mean \pm SD, $n=5$ mice) of fIPSP frequency (**d**) and pyramidal population firing rate (**e**) in control (baseline) and in presence of PSEM ($* p < 0.05$) in WT animals. (**f**) Individual pyramidal cells firing rates ($n=46$ putative pyramidal cells from 5 mice) in control ("before2" corresponds to the 10min period that immediately precedes PSEM-89S injection) and in presence of PSEM ("after1" is the period from 5 to 15min after PSEM-89S injection).

II- Discussion

Ce travail montre que la réponse post-synaptique directe des cellules pyramidales de l'hippocampe à la transmission GABAergiques périsonmatique dans CA3 peut être enregistrée de manière extracellulaire, en tant que potentiel postsynaptique inhibiteur de champ (fIPSP), et que la polarité de ces fIPSPs pourrait être utilisée comme indice du gradient de chlore et de polarité de transmission GABAergique. En effet, les interneurons exprimant la PV (cellules en panier et en chandelier) ont un axone densément arborisé spécifiquement confiné à la couche pyramidale et touchent une grande partie des cellules pyramidales d'une zone de projection restreinte (Sik, Penttonen et al. 1995, Halasy, Buhl et al. 1996). Par conséquent, chaque potentiel d'action d'un interneurone déclenche la libération synchrone de GABA sur des milliers de cellules pyramidales à la fois, ce qui produit une réponse de champ moyen postsynaptique facilement identifiable avec une électrode extracellulaire locale (Glickfeld, Roberts et al. 2009, Bazelot, Dinocourt et al. 2010, Beyeler, Retailleau et al. 2013, Dine, Kuhne et al. 2014). Cette approche est bien adaptée pour la préservation du gradient chlore naturel, de la dynamique neuronale des circuits et peut être facilement réalisée *in vivo*.

De façon intéressante, l'expression des fIPSPs est largement spécifique de la région CA3, puisqu'ils ne sont exprimés que de façon anecdotique ou à très faible fréquence dans le circuit de CA1 (Beyeler, Retailleau et al. 2013). Cependant, il est possible d'évoquer des fIPSPs dans CA1 *in vitro* en stimulant les interneurons avec de l'optogénétique (tous les interneurons de façon non spécifique sur une lignée de souris GABA-ChR2) ce qui montre que ce circuit est capable de les générer (Dine, Kuhne et al. 2014). Si l'inhibition périsonmatique par les interneurons PV en panier et en chandelier a été largement mise en évidence dans ces deux microcircuits (Lawrence and McBain 2003, Freund and Katona 2007, Pelkey, Chittajallu et al. 2017), ils diffèrent quant à la présence de collatérales excitatrices (uniquement dans CA3) et ne présentent donc pas les mêmes contraintes quant aux interactions entre excitation et inhibition. Des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre ces différences régionales, qui incluant potentiellement une excitabilité moindre des interneurons PV de CA1, une synapse pyramide-interneurone PV moins efficace, ou une connectivité entre cellule pyramidale vers

les interneurons PV inférieure dans CA1. Il serait donc intéressant de quantifier également l'efficacité des connexions repérées *in vivo* (proportion de potentiels d'action de la cellule pyramidale présynaptique qui déclenchent le recrutement de l'interneurone post-synaptique), qui a été estimée précédemment à 10-20% dans CA1 (Csicsvari, Hirase et al. 1998) et n'a pas été quantifiée dans CA3.

L'analyse de la relation temporelle entre l'excitation (potentiels d'action des cellules pyramidales) et l'inhibition GABAergique périsonomatique (fIPSPs) dans un réseau dynamique comme l'aire CA3 de l'hippocampe, permet une meilleure compréhension du codage neuronal ainsi que le traitement de l'information. Selon la théorie Hebbienne, la mémoire est supportée par des assemblées cellulaires. Elles sont constituées de neurones qui supportent les différents attributs d'une représentation mentale donnée, qui vont décharger ensemble, potentialiser leur interaction synaptique et ainsi renforcer leur interconnexion, si bien que l'activation ultérieure d'une partie de cette assemblée va réactiver l'ensemble de l'assemblée cellulaire originelle (Buzsaki 1989, Magee and Johnston 1997, Paulsen and Moser 1998, Harris, Csicsvari et al. 2003). Par conséquent, et selon cette hypothèse, dans ces réseaux, l'expression des assemblées cellulaires nécessite un contrôle inhibiteur puissant pour délimiter ces assemblés dans le temps. L'inhibition de type périsonomatique, étudiée au cours de cette thèse via l'observation de fIPSPs, pourrait constituer un excellent candidat à cette fonction de délimitation des assemblées, notamment dû à son caractère puissant et rapide. Cependant, des investigations supplémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse ; l'étude notamment des groupes de neurones déchargeant ensemble entre des fIPSPs permettrait de montrer que ce type d'inhibition permet de compartimenter les décharges neuronales en groupes d'activité récurrents qui constitueraient la base des assemblées cellulaires, prérequis indispensable à la théorie Hebbienne de la mémoire. De plus, l'inactivation spécifique des interneurons PV de CA3 chez l'animal anesthésié n'entraîne pas d'activité épileptique, mais une réorganisation de la décharge individuelle des cellules pyramidales, ce qui montre que ces interneurons ont un rôle beaucoup plus fonctionnel que de simplement limiter l'emballement du système. L'utilisation de la même technique, lorsque l'animal code activement son environnement (activation de cellules de lieux), permettrait de montrer le rôle de ces interneurons dans le codage neuronal et l'élaboration d'une carte mentale.

Dans cette thèse, nous rapportons que les décharges hyper-synchronisées transitoires induisent une inversion globale du gradient chlore des neurones et de la polarité de la transmission GABAergique, passant d'inhibiteur à excitateur pendant plusieurs dizaines de secondes avant

de revenir à une polarité et à une efficacité normale, mais uniquement durant la période post-crise, période au cours de laquelle les neurones (y compris les interneurons GABAergiques) sont silencieux, remettant en cause la contribution du GABA excitateur à la prolongation des crises. De nombreuses études montrent qu'une mauvaise régulation du chlore, par une modification de l'activité de NKCC1 et KCC2, contribuerait différemment à la génération de syndromes épileptiques ou de l'hyperexcitabilité neuronale. (Pathak, Weissinger et al. 2007, Bragin, Sanderson et al. 2009, Barmashenko, Hefft et al. 2011, Nardou, Yamamoto et al. 2011, Chen, Wan et al. 2017, Moore, Kelley et al. 2017, Di Cristo, Awad et al. 2018, Magloire, Cornford et al. 2019). Les avantages supposés d'antagonistes de NKCC1 tels que la bumétanide pour limiter les crises d'épilepsie sont donc liés à l'hypothèse que NKCC1 chargerait le Cl⁻ pendant les crises et qu'il participe à l'homéostasie du chlore avec son partenaire KCC2. Or, dans leur étude *in vitro*, Glykys et al ont suggéré que la forte concentration de Cl⁻ intracellulaire après les crises pouvait être due à un œdème cellulaire (c'est-à-dire trop d'eau et de sel, y compris de chlore, dans la cellule), ce qui entrainerait une transmission GABAergique excitatrice (Glykys, Dzhala et al. 2014). Un scénario alternatif est celui de l'ouverture des récepteurs GABA-A durant la crise qui, alors que les pyramides sont dépolarisées, fixe une valeur de potentiel d'inversion du GABA (EGABA) élevée. La bumétanide devrait empêcher l'accumulation de chlore et un retour plus rapide à une transmission GABAergique normale en post-crise dans le premier cas, mais pas dans le second scénario.

Nous avons donc commencé à étudier les effets du VU0463271 pour éclaircir la contribution respective de NKCC1 et de KCC2 à la transmission GABAergique excitatrice après des crises aiguës *in vivo*. Pour ce faire, nous avons appliqué le même protocole que précédemment en condition tête fixée en injectant cet antagoniste directement dans l'hippocampe que nous enregistrons tout en provoquant des crises en contra-latéral avec de la bicuculline. Nos premiers résultats ont montré que l'injection de VU aggravait les réponses évoquées par la stimulation des interneurons PV après les crises passant de simples fIPSPs inversés à des évènements plus complexes suggérant le rôle essentiel de KCC2 à expulser le chlore pendant et après les crises (n = 2 souris ; **Figure 13**). Cependant nous n'avons pas réussi à reproduire ces résultats. Une hypothèse pouvant expliquer ce manque de reproductibilité serait les différents lots de VU que nous avons utilisé. En effet, les premiers résultats ont été obtenus avec le même lot tandis que les expérimentations qui ont suivi ont été réalisées avec un lot de VU différent, suggérant un défaut de la drogue utilisée. De plus, cet agent comporte plusieurs défauts : il est extrêmement difficile à diluer et il s'inactive très vite après dilution. Des expérimentations supplémentaires

sont prévues avec d'autres lots de cette drogue ainsi que des tests *in vitro* qui nous permettraient de vérifier son efficacité une fois réceptionnée et ainsi de trancher sur son effet observé *in vivo* et donc sur le rôle de KCC2 à la transmission GABAergique excitatrice après des crises aiguës *in vivo*.

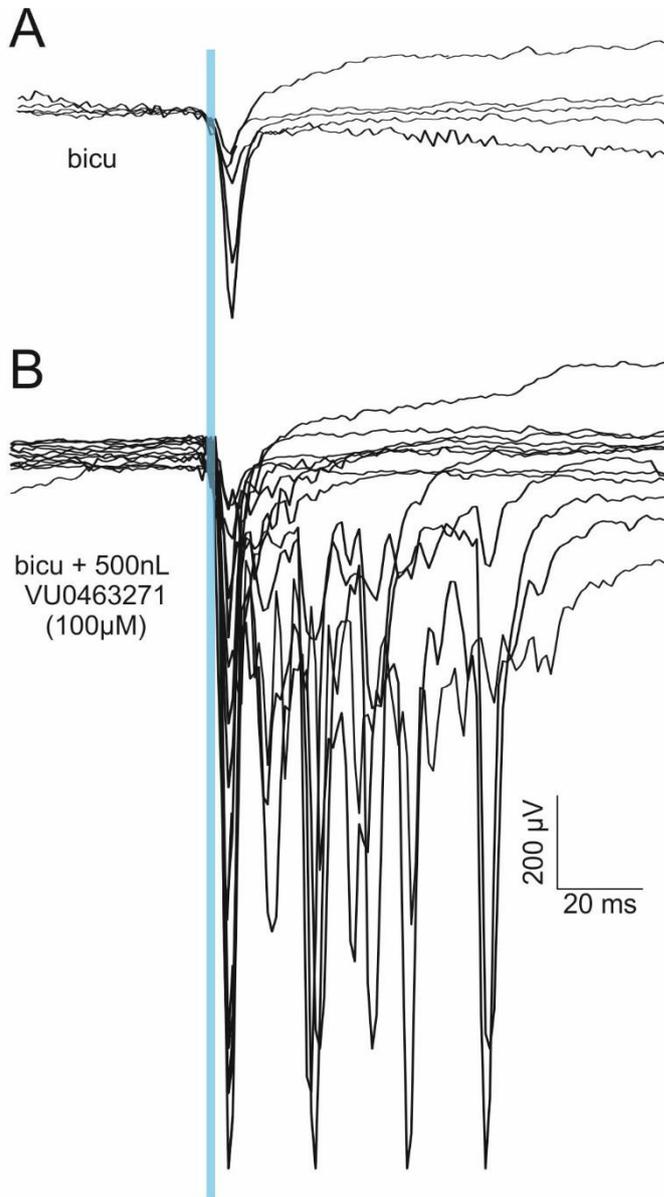


Figure 14 : L'inhibition de KCC2 aggrave la réponse GABAergique évoquée en post-crise. (A) Réponse GABAergique évoquée par l'activation optogénétique des interneurons PV en post-crise. L'inversion des fIPSPs évoqués est témoin de l'inversion de la polarité de la transmission GABAergique (B) Réponse GABAergique évoquée par l'activation optogénétique des interneurons PV en post-crise après injection locale de VU0463271 (500nL ; 100µM). L'injection de VU aggrave la réponse GABAergique dépolarisante.

Nos travaux montrent également que la transmission GABAergique excitatrice durant la phase de latence qui précède l'épilepsie chronique est en fait anecdotique, mais que la majorité des

cellules pyramidales échappent à l'inhibition périsonmatique. Les conséquences fonctionnelles d'une transmission GABAergique excitatrice dans une minorité de neurones et défectueuse dans une majorité de pyramides, à la fois en termes de codage et de dynamique de circuit, restent à élucider. En effet, indépendamment de la génération de crises, une transmission GABAergique altérée pourrait affecter de manière significative le traitement neuronal et le codage de l'information. Par exemple, une observation intéressante faite pendant la période entre l'injection d'agent convulsivant et les enregistrements électrophysiologiques, est que les souris injectées ne faisaient pas leur nid ou très mal comparé aux animaux contrôles. La construction du nid est altérée dans certains modèles de pathologies neurodéveloppementales comme la TSA (Jirkof 2014, Carreno-Munoz, Martins et al. 2017) suggérant des altérations cognitives rapidement après l'injection de kaïnate.

La détection extracellulaire des fIPSPs périsonmatiques constitue donc un formidable outil pour évaluer l'homéostasie et la fonction inhibitrice du chlore, dans des conditions physiologiques et dans des situations dans lesquelles une altération voire une inversion de la transmission GABAergique est suspectée. Cette approche ouvre de nouvelles possibilités pour évaluer la pertinence de l'hypothèse d'une transmission GABAergique excitatrice dans les troubles du spectre autistique, la schizophrénie ou diverses formes d'épilepsie, mais également dans le développement physiologique. En effet, si la majorité des études tendent à montrer la nature dépolarisante de la transmission GABAergique durant le développement, cette observation fait encore débat dans la communauté neuroscientifique et reste à être démontré *in vivo*. Cependant, si l'étude des fIPSPs *in vivo* semble être une solution idéale pour répondre à cette question, elle ne peut se faire que si le réseau des interneurons PV est « mature » dans CA3, c'est-à-dire que l'arborisation axonale de ces interneurons soit suffisamment développée pour l'observation des fIPSPs en potentiel de champs. En effet, il a été montré que le développement de l'arborisation axonique des interneurons PV, dans le Gyrus Denté, augmentait de 600 % entre P6 et P21 et avec elle la puissance des oscillations gamma (Doischer, Hosp et al. 2008). La seule façon de savoir si le réseau des interneurons PV est suffisamment développé pour observer les fIPSPs est d'enregistrement l'activité précoce de CA3 lors du développement, de P0 à P7. Si le réseau le permet, les fIPSPs permettraient de trancher définitivement la question de la polarité de la transmission GABAergique durant la séquence développementale de l'hippocampe.

III- Références bibliographiques

- Acton, B. A., V. Mahadevan, A. Mercado, P. Uvarov, Y. Ding, J. Pressey, M. S. Airaksinen, D. B. Mount and M. A. Woodin (2012). "Hyperpolarizing GABAergic transmission requires the KCC2 C-terminal ISO domain." *J Neurosci* **32**(25): 8746-8751.
- Akaike, N. (1996). "Gramicidin perforated patch recording and intracellular chloride activity in excitable cells." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **65**(3): 251-264.
- Alkondon, M. and E. X. Albuquerque (2001). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus." *J Neurophysiol* **86**(6): 3043-3055.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." *Neuroscience* **31**(3): 571-591.
- Assaf, F. and Y. Schiller (2016). "The antiepileptic and ictogenic effects of optogenetic neurostimulation of PV-expressing interneurons." *J Neurophysiol* **116**(4): 1694-1704.
- Ayala, G. F., H. Matsumoto and R. J. Gumnit (1970). "Excitability changes and inhibitory mechanisms in neocortical neurons during seizures." *J Neurophysiol* **33**(1): 73-85.
- Barmashenko, G., S. Hefft, A. Aertsen, T. Kirschstein and R. Kohling (2011). "Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus." *Epilepsia* **52**(9): 1570-1578.
- Baroncelli, L., M. C. Cenni, R. Melani, G. Deidda, S. Landi, R. Narducci, L. Cancedda, L. Maffei and N. Berardi (2017). "Early IGF-1 primes visual cortex maturation and accelerates developmental switch between NKCC1 and KCC2 chloride transporters in enriched animals." *Neuropharmacology* **113**(Pt A): 167-177.
- Barria, A., D. Muller, V. Derkach, L. C. Griffith and T. R. Soderling (1997). "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation." *Science* **276**(5321): 2042-2045.
- Bartos, M., I. Vida and P. Jonas (2007). "Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks." *Nat Rev Neurosci* **8**(1): 45-56.
- Baumann, S. W., R. Baur and E. Sigel (2003). "Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors." *J Neurosci* **23**(35): 11158-11166.
- Bazélot, M., C. Dinocourt, I. Cohen and R. Miles (2010). "Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus." *J Physiol* **588**(Pt 12): 2077-2090.
- Ben-Ari, Y. (2002). "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 728-739.
- Ben-Ari, Y. (2006). "Seizures Beget Seizures: The Quest for GABA as a Key Player." **18**(1-2): 135-144.
- Ben-Ari, Y. (2007). "GABA excites and sculpts immature neurons well before delivery: modulation by GABA of the development of ventricular progenitor cells." *Epilepsy Curr* **7**(6): 167-169.
- Ben-Ari, Y. (2017). "NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders." *Trends in Neurosciences* **40**(9): 536-554.
- Ben-Ari, Y., E. Cherubini, R. Corradetti and J. L. Gaiarsa (1989). "Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones." *J Physiol* **416**: 303-325.
- Beyeler, A., A. Retailleau, C. Molter, A. Mehidi, J. Szabadics and X. Leinekugel (2013). "Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity In Vitro." *PLoS One* **8**(6): e66509.
- Bezaire, M. J. and I. Soltesz (2013). "Quantitative assessment of CA1 local circuits: knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity." *Hippocampus* **23**(9): 751-785.
- Bi, M. M., S. Hong, H. Y. Zhou, H. W. Wang, L. N. Wang and Y. J. Zheng (2013). "Chloride channelopathies of ClC-2." *Int J Mol Sci* **15**(1): 218-249.
- Blaesse, P., M. S. Airaksinen, C. Rivera and K. Kaila (2009). "Cation-chloride cotransporters and neuronal function." *Neuron* **61**(6): 820-838.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* **232**(2): 331-356.

Blitzer, R. D., O. Gil and E. M. Landau (1990). "Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus." *Neurosci Lett* **119**(2): 207-210.

Bos, R., K. Sadlaoud, P. Boulenguez, D. Buttigieg, S. Liabeuf, C. Brocard, G. Haase, H. Bras and L. Vinay (2013). "Activation of 5-HT_{2A} receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(1): 348-353.

Bos, R. and L. Vinay (2012). "Glucose is an adequate energy substrate for the depolarizing action of GABA and glycine in the neonatal rat spinal cord in vitro." *J Neurophysiol* **107**(11): 3107-3115.

Bragin, A., G. Jando, Z. Nadasdy, J. Hetke, K. Wise and G. Buzsaki (1995). "Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat." *The Journal of Neuroscience* **15**: 47-60.

Bragin, A., G. Jando, Z. Nadasdy, M. van Landeghem and G. Buzsaki (1995). "Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat." *J Neurophysiol* **73**(4): 1691-1705.

Bragin, D. E., J. L. Sanderson, S. Peterson, J. A. Connor and W. S. Muller (2009). "Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus." *Eur J Neurosci* **30**(4): 611-624.

Browne, T. R. and G. L. Holmes (2001). "Epilepsy." *N Engl J Med* **344**(15): 1145-1151.

Bruining, H., L. Passtoors, N. Goriounova, F. Jansen, B. Hakvoort, M. de Jonge and S. S. Poil (2015). "Paradoxical Benzodiazepine Response: A Rationale for Bumetanide in Neurodevelopmental Disorders?" *Pediatrics* **136**(2): e539-543.

Burgard, E. C. and J. M. Sarvey (1990). "Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus." *Neurosci Lett* **116**(1-2): 34-39.

Buzsaki, G. (1989). "Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states." *Neuroscience* **31**(3): 551-570.

Buzsaki, G. (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." *Neuron* **33**(3): 325-340.

Buzsaki, G. (2015). "Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning." *Hippocampus* **25**(10): 1073-1188.

Buzsaki, G. and J. J. Chrobak (1995). "Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks." *Curr Opin Neurobiol* **5**(4): 504-510.

Buzsaki, G. and W. Freeman (2015). "Editorial overview: brain rhythms and dynamic coordination." *Curr Opin Neurobiol* **31**: v-ix.

Buzsaki, G., M. Penttonen, Z. Nadasdy and A. Bragin (1996). "Pattern and inhibition-dependent invasion of pyramidal cell dendrites by fast spikes in the hippocampus in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9921-9925.

Buzsaki, G. and X. J. Wang (2012). "Mechanisms of gamma oscillations." *Annu Rev Neurosci* **35**: 203-225.

Capo-Aponte, J. E., Z. Wang, M. A. Akinci, J. M. Wolosin, K. S. Pokorny, P. Iserovich and P. S. Reinach (2007). "Potassium-chloride cotransporter mediates cell cycle progression and proliferation of human corneal epithelial cells." *Cell Cycle* **6**(21): 2709-2718.

Cardarelli, R. A., K. Jones, L. I. Pisella, H. J. Wobst, L. J. McWilliams, P. M. Sharpe, M. P. Burnham, D. J. Baker, I. Chudotvorova, J. Guyot, L. Silayeva, D. H. Morrow, N. Dekker, S. Zicha, P. A. Davies, J. Holenz, M. E. Duggan, J. Dunlop, R. J. Mather, Q. Wang, I. Medina, N. J. Brandon, T. Z. Deeb and S. J. Moss (2017). "The small molecule CLP257 does not modify activity of the K(+)-Cl(-) co-transporter KCC2 but does potentiate GABA_A receptor activity." *Nat Med* **23**(12): 1394-1396.

Cardin, J. A., M. Carlen, K. Meletis, U. Knoblich, F. Zhang, K. Deisseroth, L. H. Tsai and C. I. Moore (2009). "Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses." *Nature* **459**(7247): 663-667.

Carreno-Munoz, M. I., F. Martins, M. C. Medrano, E. Aloisi, S. Pietropaolo, C. Dechaud, E. Subashi, G. Bony, M. Ginger, A. Moujahid, A. Frick and X. Leinekugel (2017). "Potential Involvement of Impaired

BKCa Channel Function in Sensory Defensiveness and Some Behavioral Disturbances Induced by Unfamiliar Environment in a Mouse Model of Fragile X Syndrome." Neuropsychopharmacology. Cellot, G., L. Maggi, M. A. Di Castro, M. Catalano, R. Migliore, M. Migliore, M. L. Scattoni, G. Calamandrei and E. Cherubini (2016). "Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice." Sci Rep **6**: 31696.

Chalifoux, J. R. and A. G. Carter (2011). "GABAB receptor modulation of voltage-sensitive calcium channels in spines and dendrites." J Neurosci **31**(11): 4221-4232.

Chavas, J., M. E. Forero, T. Collin, I. Llano and A. Marty (2004). "Osmotic tension as a possible link between GABA(A) receptor activation and intracellular calcium elevation." Neuron **44**(4): 701-713.

Chavas, J. and A. Marty (2003). "Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network." J Neurosci **23**(6): 2019-2031.

Chen, L., L. Wan, Z. Wu, W. Ren, Y. Huang, B. Qian and Y. Wang (2017). "KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures." Sci Rep **7**(1): 156.

Chrobak, J. J. and G. Buzsaki (1998). "Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat." The Journal of Neuroscience **18**: 388-398.

Cohen, I., V. Navarro, S. Clemenceau, M. Baulac and R. Miles (2002). "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro." Science **298**(5597): 1418-1421.

Cossart, R., C. Bernard and Y. Ben-Ari (2005). "Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies." Trends Neurosci **28**(2): 108-115.

Cowan, L. D. (2002). "The epidemiology of the epilepsies in children." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **8**(3): 171-181.

Crepel, V. and C. Mulle (2015). "Physiopathology of kainate receptors in epilepsy." Curr Opin Pharmacol **20**: 83-88.

Csicsvari, J., H. Hirase, A. Czurko and G. Buzsaki (1998). "Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat." Neuron **21**(1): 179-189.

Csicsvari, J., H. Hirase, A. Czurko, A. Mamiya and G. Buzsaki (1999). "Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat." J Neurosci **19**(1): 274-287.

Csicsvari, J., H. Hirase, A. Mamiya and G. Buzsaki (2000). "Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events." Neuron **28**(2): 585-594.

Csicsvari, J., B. Jamieson, K. D. Wise and G. Buzsaki (2003). "Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat." Neuron **37**(2): 311-322.

Dasari, S. and A. T. Gullledge (2011). "M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons." J Neurophysiol **105**(2): 779-792.

Davies, C. H., S. J. Starkey, M. F. Pozza and G. L. Collingridge (1991). "GABA autoreceptors regulate the induction of LTP." Nature **349**(6310): 609-611.

de Boer, H. M., M. Mula and J. W. Sander (2008). "The global burden and stigma of epilepsy." Epilepsy Behav **12**(4): 540-546.

de la Prida, L. M., G. Huberfeld, I. Cohen and R. Miles (2006). "Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts." Neuron **49**(1): 131-142.

Deidda, G., M. Parrini, S. Naskar, I. F. Bozarth, A. Contestabile and L. Cancedda (2015). "Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome." Nat Med **21**(4): 318-326.

Delpire, E., A. Baranczak, A. G. Waterson, K. Kim, N. Kett, R. D. Morrison, J. S. Daniels, C. D. Weaver and C. W. Lindsley (2012). "Further optimization of the K-Cl cotransporter KCC2 antagonist ML077: development of a highly selective and more potent in vitro probe." Bioorg Med Chem Lett **22**(14): 4532-4535.

Deng, P. Y., Z. Xiao, C. Yang, L. Rojanathammanee, L. Grisanti, J. Watt, J. D. Geiger, R. Liu, J. E. Porter and S. Lei (2009). "GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K+ channels." Neuron **63**(2): 230-243.

Di Cristo, G., P. N. Awad, S. Hamidi and M. Avoli (2018). "KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders." *Prog Neurobiol* **162**: 1-16.

Dine, J., C. Kuhne, J. M. Deussing and M. Eder (2014). "Optogenetic evocation of field inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal slices: a simple and reliable approach for studying pharmacological effects on GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission." *Front Cell Neurosci* **8**: 2.

Doischer, D., J. A. Hosp, Y. Yanagawa, K. Obata, P. Jonas, I. Vida and M. Bartos (2008). "Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices." *J Neurosci* **28**(48): 12956-12968.

Doyon, N., F. Ferrini, M. Gagnon and Y. De Koninck (2013). "Treating pathological pain: is KCC2 the key to the gate?" *Expert Rev Neurother* **13**(5): 469-471.

Doyon, N., L. Vinay, Steven A. Prescott and Y. De Koninck (2016). "Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition." *Neuron* **89**(6): 1157-1172.

Dragoi, G. and G. Buzsaki (2006). "Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies." *Neuron* **50**(1): 145-157.

Duran, C., C. H. Thompson, Q. Xiao and H. C. Hartzell (2010). "Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable." *Annu Rev Physiol* **72**: 95-121.

Dzhala, V., G. Valeeva, J. Glykys, R. Khazipov and K. Staley (2012). "Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain." *J Neurosci* **32**(12): 4017-4031.

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

Ebihara, S., K. Shirato, N. Harata and N. Akaike (1995). "Gramicidin-perforated patch recording: GABA response in mammalian neurones with intact intracellular chloride." *J Physiol* **484 (Pt 1)**: 77-86.

Elfant, D., B. Z. Pal, N. Emptage and M. Capogna (2008). "Specific inhibitory synapses shift the balance from feedforward to feedback inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells." *Eur J Neurosci* **27**(1): 104-113.

English, D. F., A. Peyrache, E. Stark, L. Roux, D. Vallentin, M. A. Long and G. Buzsáki (2014). "Excitation and Inhibition Compete to Control Spiking during Hippocampal Ripples: Intracellular Study in Behaving Mice." *The Journal of Neuroscience* **34**(49): 16509-16517.

Erker, T., C. Brandt, K. Tollner, P. Schreppel, F. Twele, A. Schidlitzki and W. Löscher (2016). "The bumetanide prodrug BUM5, but not bumetanide, potentiates the antiseizure effect of phenobarbital in adult epileptic mice." *Epilepsia* **57**(5): 698-705.

Escayg, A. and A. L. Goldin (2010). "Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms." *Epilepsia* **51**(9): 1650-1658.

Fisher, R. S., W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee and J. Engel, Jr. (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* **46**(4): 470-472.

Forro, T., O. Valenti, B. Lasztocki and T. Klausberger (2015). "Temporal organization of GABAergic interneurons in the intermediate CA1 hippocampus during network oscillations." *Cereb Cortex* **25**(5): 1228-1240.

Freund, T. F. and G. Buzsaki (1996). "Interneurons of the hippocampus." *Hippocampus* **6**(4): 347-470.

Freund, T. F. and I. Katona (2007). "Perisomatic inhibition." *Neuron* **56**(1): 33-42.

Fricke, D. and R. Miles (2000). "EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons." *Neuron* **28**(2): 559-569.

Fu, P., R. Tang, Z. Yu, S. Huang, M. Xie, X. Luo and W. Wang (2015). "Bumetanide-induced NKCC1 inhibition attenuates oxygen-glucose deprivation-induced decrease in proliferative activity and cell cycle progression arrest in cultured OPCs via p-38 MAPKs." *Brain Res* **1613**: 110-119.

Fuchs, E. C., A. R. Zivkovic, M. O. Cunningham, S. Middleton, F. E. Lebeau, D. M. Bannerman, A. Rozov, M. A. Whittington, R. D. Traub, J. N. Rawlins and H. Monyer (2007). "Recruitment of

parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior." *Neuron* **53**(4): 591-604.

Gagnon, M., M. J. Bergeron, G. Lavertu, A. Castonguay, S. Tripathy, R. P. Bonin, J. Perez-Sanchez, D. Boudreau, B. Wang, L. Dumas, I. Valade, K. Bachand, M. Jacob-Wagner, C. Tardif, I. Kianicka, P. Isenring, G. Attardo, J. A. M. Coull and Y. De Koninck (2013). "Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases." *Nature medicine* **19**(11): 1524-1528.

Gan, J., S. M. Weng, A. J. Pernia-Andrade, J. Csicsvari and P. Jonas (2017). "Phase-Locked Inhibition, but Not Excitation, Underlies Hippocampal Ripple Oscillations in Awake Mice In Vivo." *Neuron* **93**(2): 308-314.

Gassmann, M., H. Shaban, R. Vigot, G. Sansig, C. Haller, S. Barbieri, Y. Humeau, V. Schuler, M. Muller, B. Kinzel, K. Klebs, M. Schmutz, W. Froestl, J. Heid, P. H. Kelly, C. Gentry, A. L. Jatton, H. Van der Putten, C. Mombereau, L. Lecourtier, J. Mosbacher, J. F. Cryan, J. M. Fritschy, A. Luthi, K. Kaupmann and B. Bettler (2004). "Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice." *J Neurosci* **24**(27): 6086-6097.

Girardeau, G., K. Benchenane, S. I. Wiener, G. Buzsaki and M. B. Zugaro (2009). "Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory." *Nature Neuroscience* **12**(10): 1222-1223.

Glickfeld, L. L., B. V. Atallah and M. Scanziani (2008). "Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids." *J Neurosci* **28**(8): 1824-1832.

Glickfeld, L. L., J. D. Roberts, P. Somogyi and M. Scanziani (2009). "Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis." *Nature neuroscience* **12**(1): 21-23.

Glykys, J., V. Dzhalala, K. Egawa, T. Balena, Y. Saponjian, K. V. Kuchibhotla, B. J. Bacsikai, K. T. Kahle, T. Zeuthen and K. J. Staley (2014). "Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration." *Science* **343**(6171): 670-675.

Glykys, J. and K. J. Staley (2016). "Developmental Decrease of Neuronal Chloride Concentration Is Independent of Trauma in Thalamocortical Brain Slices." *PLoS One* **11**(6): e0158012.

Goldberg, E. M. and D. A. Coulter (2013). "Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction." *Nat Rev Neurosci* **14**(5): 337-349.

Goutierre, M., S. Al Awabdh, F. Donneger, E. François, D. Gomez-Dominguez, T. Irinopoulou, L. Menendez de la Prida and J. C. Poncer (2019). "KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels." *Cell Reports* **28**(1): 91-103.e107.

Gulledge, A. T. and G. J. Stuart (2003). "Excitatory actions of GABA in the cortex." *Neuron* **37**(2): 299-309.

Gulyas, A. I., A. Sik, J. A. Payne, K. Kaila and T. F. Freund (2001). "The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **13**(12): 2205-2217.

Gulyas, A. I., G. G. Szabo, I. Ulbert, N. Holderith, H. Monyer, F. Erdelyi, G. Szabo, T. F. Freund and N. Hajos (2010). "Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus." *J Neurosci* **30**(45): 15134-15145.

Guo, Y., M. Su, M. A. McNutt and J. Gu (2009). "Expression and distribution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in neurons of the spinal cord." *J Neurosci Res* **87**(16): 3611-3619.

Hadjikhani, N., N. R. Zurcher, O. Rogier, T. Ruest, L. Hippolyte, Y. Ben-Ari and E. Lemonnier (2015). "Improving emotional face perception in autism with diuretic bumetanide: a proof-of-concept behavioral and functional brain imaging pilot study." *Autism* **19**(2): 149-157.

Halasy, K., E. H. Buhl, Z. Lorinczi, G. Tamas and P. Somogyi (1996). "Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus." *Hippocampus* **6**(3): 306-329.

Harris, K. D., J. Csicsvari, H. Hirase, G. Dragoi and G. Buzsaki (2003). "Organization of cell assemblies in the hippocampus." *Nature* **424**(6948): 552-556.

Hasselmo, M. E. (2006). "The role of acetylcholine in learning and memory." Curr Opin Neurobiol **16**(6): 710-715.

Hasselmo, M. E. and L. M. Giocomo (2006). "Cholinergic modulation of cortical function." J Mol Neurosci **30**(1-2): 133-135.

Hasselmo, M. E. and J. McGaughy (2004). "High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation." Prog Brain Res **145**: 207-231.

Hasselmo, M. E. and E. Schnell (1994). "Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology." J Neurosci **14**(6): 3898-3914.

Hasselmo, M. E. and B. P. Wyble (1997). "Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: simulating effects of scopolamine on human memory function." Behav Brain Res **89**(1-2): 1-34.

Hebb, D. O. (1949). The organization of behaviour. New York, John Wiley and Sons.

Higley, M. J. (2014). "Localized GABAergic inhibition of dendritic Ca(2+) signalling." Nat Rev Neurosci **15**(9): 567-572.

Holmgren, C. D., M. Mukhtarov, A. E. Malkov, I. Y. Popova, P. Bregestovski and Y. Zilberter (2010). "Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex in vitro." J Neurochem **112**(4): 900-912.

Huang, C. C. and K. S. Hsu (2012). "Activation of NMDA receptors reduces metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression in the nucleus accumbens via a CaMKII-dependent mechanism." Neuropharmacology **63**(8): 1298-1307.

Huberfeld, G., T. Blauwblomme and R. Miles (2015). "Hippocampus and epilepsy: Findings from human tissues." Rev Neurol (Paris) **171**(3): 236-251.

Huberfeld, G., L. Wittner, S. Clemenceau, M. Baulac, K. Kaila, R. Miles and C. Rivera (2007). "Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy." J Neurosci **27**(37): 9866-9873.

Hubner, C. A., V. Stein, I. Hermans-Borgmeyer, T. Meyer, K. Ballanyi and T. J. Jentsch (2001). "Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition." Neuron **30**(2): 515-524.

Huerta, P. T. and J. E. Lisman (1993). "Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state." Nature **364**(6439): 723-725.

Huxter, J. R., T. J. Senior, K. Allen and J. Csicsvari (2008). "Theta phase-specific codes for two-dimensional position, trajectory and heading in the hippocampus." Nature Neuroscience **11**(5): 587-594.

Jefferys, J. G. (2010). "Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures." Seizure **19**(10): 638-646.

Jensen, O. and L. L. Colgin (2007). "Cross-frequency coupling between neuronal oscillations." Trends Cogn Sci **11**(7): 267-269.

Jentsch, T. J. (2008). "CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology." Crit Rev Biochem Mol Biol **43**(1): 3-36.

Jirkof, P. (2014). "Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice." J Neurosci Methods **234**: 139-146.

Kahle, K. T. and E. Delpire (2016). "Kinase-KCC2 coupling: Cl⁻ rheostasis, disease susceptibility, therapeutic target." J Neurophysiol **115**(1): 8-18.

Karadshah, M. F. and E. Delpire (2001). "Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons." J Neurophysiol **85**(2): 995-997.

Kaupmann, K., K. Huggel, J. Heid, P. J. Flor, S. Bischoff, S. J. Mickel, G. McMaster, C. Angst, H. Bittiger, W. Froestl and B. Bettler (1997). "Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors." Nature **386**(6622): 239-246.

Kelsch, W., S. Hormuzdi, E. Straube, A. Lewen, H. Monyer and U. Misgeld (2001). "Insulin-like growth factor 1 and a cytosolic tyrosine kinase activate chloride outward transport during maturation of hippocampal neurons." *J Neurosci* **21**(21): 8339-8347.

Khalilov, I., V. Dzhalala, I. Medina, X. Leinekugel, Z. Melyan, K. Lamsa, R. Khazipov and Y. Ben-Ari (1999). "Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro." *Eur J Neurosci* **11**(10): 3468-3480.

Kharod, S. C., S. K. Kang and S. D. Kadam (2019). "Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview." *Front Neurosci* **13**: 310.

Khirug, S., J. Yamada, R. Afzalov, J. Voipio, L. Khiroug and K. Kaila (2008). "GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1." *J Neurosci* **28**(18): 4635-4639.

Kirmse, K., M. Kummer, Y. Kovalchuk, O. W. Witte, O. Garaschuk and K. Holthoff (2015). "GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo." *Nat Commun* **6**: 7750.

Klausberger, T., P. J. Magill, L. F. Marton, J. D. Roberts, P. M. Cobden, G. Buzsaki and P. Somogyi (2003). "Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo." *Nature* **421**(6925): 844-848.

Klausberger, T., L. F. Marton, A. Baude, J. D. Roberts, P. J. Magill and P. Somogyi (2004). "Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo." *Nat Neurosci* **7**(1): 41-47.

Klausberger, T. and P. Somogyi (2008). "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations." *Science* **321**(5885): 53-57.

Kourdougli, N., C. Pellegrino, J. M. Renko, S. Khirug, G. Chazal, T. K. Kukko-Lukjanov, S. E. Lauri, J. L. Gaiarsa, L. Zhou, A. Peret, E. Castren, R. K. Tuominen, V. Crepel and C. Rivera (2017). "Depolarizing gamma-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy." *Ann Neurol* **81**(2): 251-265.

Krook-Magnuson, E., C. Armstrong, M. Oijala and I. Soltesz (2013). "On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy." *Nat Commun* **4**: 1376.

Kulik, A., I. Vida, Y. Fukazawa, N. Guetg, Y. Kasugai, C. L. Marker, F. Rigato, B. Bettler, K. Wickman, M. Frotscher and R. Shigemoto (2006). "Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K⁺ channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells." *J Neurosci* **26**(16): 4289-4297.

Kullmann, D. M. (2011). "Interneuron networks in the hippocampus." *Curr Opin Neurobiol* **21**(5): 709-716.

Lansner, A. (2009). "Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations." *Trends Neurosci* **32**(3): 178-186.

Lawrence, J. J. and C. J. McBain (2003). "Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus." *Trends Neurosci* **26**(11): 631-640.

Lee, S. H., I. Marchionni, M. Bezaire, C. Varga, N. Danielson, M. Lovett-Barron, A. Losonczy and I. Soltesz (2014). "Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells." *Neuron* **82**(5): 1129-1144.

Lemonnier, E. and Y. Ben-Ari (2010). "The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects." *Acta Paediatr* **99**(12): 1885-1888.

Lemonnier, E., C. Degrez, M. Phelep, R. Tyzio, F. Josse, M. Grandgeorge, N. Hadjikhani and Y. Ben-Ari (2012). "A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children." *Transl.Psychiatry* **2**: e202.

Lemonnier, E., N. Villeneuve, S. Sonie, S. Serret, A. Rosier, M. Roue, P. Brosset, M. Viellard, D. Bernoux, S. Rondeau, S. Thummler, D. Ravel and Y. Ben-Ari (2017). "Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders." *Transl Psychiatry* **7**(3): e1056.

Li, X., J. Zhou, Z. Chen, S. Chen, F. Zhu and L. Zhou (2008). "Long-term expressional changes of Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter 1 (NKCC1) and K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE)." *Brain Research* **1221**: 141-146.

Li, X. G., P. Somogyi, A. Ylinen and G. Buzsaki (1994). "The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study." *J Comp Neurol* **339**(2): 181-208.

Lisman, J., H. Schulman and H. Cline (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 175-190.

Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo and F. Schottler (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature* **305**(5936): 719-721.

Maccaferri, G., J. D. Roberts, P. Szucs, C. A. Cottingham and P. Somogyi (2000). "Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro." *J Physiol* **524 Pt 1**: 91-116.

Magalhaes, A. C. and C. Rivera (2016). "NKCC1-Deficiency Results in Abnormal Proliferation of Neural Progenitor Cells of the Lateral Ganglionic Eminence." *Front Cell Neurosci* **10**: 200.

Magee, J. C. and D. Johnston (1997). "A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons." *Science* **275**(5297): 209-213.

Magloire, V., J. Cornford, A. Lieb, D. M. Kullmann and I. Pavlov (2019). "KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition." *Nat Commun* **10**(1): 1225.

Malenka, R. C. (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD." *Cell* **78**(4): 535-538.

Malenka, R. C., J. A. Kauer, R. S. Zucker and R. A. Nicoll (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." *Science* **242**(4875): 81-84.

Markram, H., J. Lubke, M. Frotscher and B. Sakmann (1997). "Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs." *Science* **275**(5297): 213-215.

Marr, D. (1971). "Simple memory: a theory for archicortex." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **262**(841): 23-81.

Matsumoto, H. and C. A. Marsan (1964). "Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Ictal Manifestations." *Exp Neurol* **9**: 305-326.

Matsumoto, H. and C. A. Marsan (1964). "Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations." *Exp Neurol* **9**: 286-304.

McNaughton, B. L. and R. G. Morris (1987). "Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system." *TINS* **10**: 408-415.

Medina, I., P. Friedel, C. Rivera, K. T. Kahle, N. Kourdougli, P. Uvarov and C. Pellegrino (2014). "Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2." *Front Cell Neurosci* **8**: 27.

Miles, R., K. Toth, A. I. Gulyas, N. Hajos and T. F. Freund (1996). "Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus." *Neuron* **16**(4): 815-823.

Miles, R. and R. K. Wong (1983). "Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus." *Nature* **306**(5941): 371-373.

Miles, R. and R. K. Wong (1986). "Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus." *J Physiol* **373**: 397-418.

Miller, P. S. and A. R. Aricescu (2014). "Crystal structure of a human GABAA receptor." *Nature* **512**(7514): 270-275.

Milner, P. M. (1993). "The mind and Donald O. Hebb." *Sci Am* **268**(1): 124-129.

Moore, Y. E., M. R. Kelley, N. J. Brandon, T. Z. Deeb and S. J. Moss (2017). "Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy." *Trends in Neurosciences* **40**(9): 555-571.

Moser, M. B., D. C. Rowland and E. I. Moser (2015). "Place cells, grid cells, and memory." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(2): a021808.

Nakazawa, K., M. C. Quirk, R. A. Chitwood, M. Watanabe, M. F. Yeckel, L. D. Sun, A. Kato, C. A. Carr, D. Johnston, M. A. Wilson and S. Tonegawa (2002). "Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall." *Science* **297**(5579): 211-218.

Nardou, R., Y. Ben-Ari and I. Khalilov (2009). "Bumetanide, an NKCC1 antagonist, does not prevent formation of epileptogenic focus but blocks epileptic focus seizures in immature rat hippocampus." *J Neurophysiol* **101**(6): 2878-2888.

Nardou, R., S. Yamamoto, G. Chazal, A. Bhar, N. Ferrand, O. Dulac, Y. Ben-Ari and I. Khalilov (2011). "Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital." *Brain* **134**(4): 987-1002.

Nilius, B. and G. Droogmans (2003). "Amazing chloride channels: an overview." *Acta Physiol Scand* **177**(2): 119-147.

O'Keefe, J. and D. H. Conway (1978). "Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire." *Exp Brain Res* **31**(4): 573-590.

O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." *Brain Res* **34**(1): 171-175.

O'Keefe, J. and M. L. Recce (1993). "Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm." *Hippocampus* **3**(3): 317-330.

Obata, K., M. Oide and H. Tanaka (1978). "Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture." *Brain Res* **144**(1): 179-184.

Ogiwara, I., H. Miyamoto, N. Morita, N. Atapour, E. Mazaki, I. Inoue, T. Takeuchi, S. Itohara, Y. Yanagawa, K. Obata, T. Furuichi, T. K. Hensch and K. Yamakawa (2007). "Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation." *J Neurosci* **27**(22): 5903-5914.

Ozawa, S., H. Kamiya and K. Tsuzuki (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.

Pallud, J., M. Le Van Quyen, F. Bielle, C. Pellegrino, P. Varlet, N. Cresto, M. Baulac, C. Duyckaerts, N. Kourdougli, G. Chazal, B. Devaux, C. Rivera, R. Miles, L. Capelle and G. Huberfeld (2014). "Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma." *Sci Transl Med* **6**(244): 244ra289.

Parra, P., A. I. Gulyas and R. Miles (1998). "How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus?" *Neuron* **20**(5): 983-993.

Pathak, H. R., F. Weissinger, M. Terunuma, G. C. Carlson, F.-C. Hsu, S. J. Moss and D. A. Coulter (2007). "Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy." *The Journal of Neuroscience* **27**(51): 14012-14022.

Paulsen, O. and E. I. Moser (1998). "A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity." *Trends Neurosci* **21**(7): 273-278.

Pawelzik, H., A. P. Bannister, J. Deuchars, M. Ilia and A. M. Thomson (1999). "Modulation of bistratified cell IPSPs and basket cell IPSPs by pentobarbitone sodium, diazepam and Zn²⁺: dual recordings in slices of adult rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **11**(10): 3552-3564.

Payne, J. A. (1997). "Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation." *Am J Physiol* **273**(5 Pt 1): C1516-1525.

Payne, J. A. and B. Forbush, 3rd (1995). "Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 493-503.

Payne, J. A., T. J. Stevenson and L. F. Donaldson (1996). "Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform." *J Biol Chem* **271**(27): 16245-16252.

Pelkey, K. A., R. Chittajallu, M. T. Craig, L. Tricoire, J. C. Wester and C. J. McBain (2017). "Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons." *Physiol Rev* **97**(4): 1619-1747.

Poncer, J. C., R. A. McKinney, B. H. Gähwiler and S. M. Thompson (1997). "Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses." *Neuron* **18**(3): 463-472.

Pouille, F. and M. Scanziani (2001). "Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition." *Science* **293**(5532): 1159-1163.

Pouille, F. and M. Scanziani (2004). "Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus." *Nature* **429**(6993): 717-723.

Raimondo, J. V., L. Kay, T. J. Ellender and C. J. Akerman (2012). "Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission." *Nat Neurosci* **15**(8): 1102-1104.

Ravizza, T., B. Gagliardi, F. Noe, K. Boer, E. Aronica and A. Vezzani (2008). "Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy." *Neurobiol Dis* **29**(1): 142-160.

Rheims, S., C. D. Holmgren, G. Chazal, J. Mulder, T. Harkany, T. Zilberter and Y. Zilberter (2009). "GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies." *J Neurochem* **110**(4): 1330-1338.

Riecki, R., I. Pavlov, J. Tornberg, S. E. Lauri, M. S. Airaksinen and T. Taira (2008). "Altered synaptic dynamics and hippocampal excitability but normal long-term plasticity in mice lacking hyperpolarizing GABA A receptor-mediated inhibition in CA1 pyramidal neurons." *J Neurophysiol* **99**(6): 3075-3089.

Rigau, V., M. Morin, M. C. Rousset, F. de Bock, A. Lebrun, P. Coubes, M. C. Picot, M. Baldy-Moulinier, J. Bockaert, A. Crespel and M. Lerner-Natoli (2007). "Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy." *Brain* **130**(Pt 7): 1942-1956.

Rivera, C., J. Voipio, J. A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma and K. Kaila (1999). "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation." *Nature* **397**(6716): 251-255.

Rost, B. R., P. Nicholson, G. Ahnert-Hilger, A. Rummel, C. Rosenmund, J. Breustedt and D. Schmitz (2011). "Activation of metabotropic GABA receptors increases the energy barrier for vesicle fusion." *J Cell Sci* **124**(Pt 18): 3066-3073.

Roux, L., B. Hu, R. Eichler, E. Stark and G. Buzsaki (2017). "Sharp wave ripples during learning stabilize the hippocampal spatial map." *Nat Neurosci* **20**(6): 845-853.

Rovira, C., E. Cherubini and Y. Ben-Ari (1982). "Opposite actions of muscarinic and nicotinic agents on hippocampal dendritic negative fields recorded in rats." *Neuropharmacology* **21**(9): 933-936.

Royer, S., B. V. Zemelman, A. Losonczy, J. Kim, F. Chance, J. C. Magee and G. Buzsaki (2012). "Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition." *Nat Neurosci* **15**(5): 769-775.

Scanziani, M. (2000). "GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity." *Neuron* **25**(3): 673-681.

Schuler, V., C. Luscher, C. Blanchet, N. Klix, G. Sansig, K. Klebs, M. Schmutz, J. Heid, C. Gentry, L. Urban, A. Fox, W. Spooren, A. L. Jatton, J. Vigouret, M. Pozza, P. H. Kelly, J. Mosbacher, W. Froestl, E. Kaslin, R. Korn, S. Bischoff, K. Kaupmann, H. van der Putten and B. Bettler (2001). "Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B₁)." *Neuron* **31**(1): 47-58.

Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**(1): 11-21.

Seja, P., M. Schonewille, G. Spitzmaul, A. Badura, I. Klein, Y. Rudhard, W. Wisden, C. A. Hubner, C. I. De Zeeuw and T. J. Jentsch (2012). "Raising cytosolic Cl⁻ in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning." *EMBO J* **31**(5): 1217-1230.

Semyanov, A., M. C. Walker, D. M. Kullmann and R. A. Silver (2004). "Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone." *Trends Neurosci* **27**(5): 262-269.

Sen, A., L. Martinian, M. Nikolic, M. C. Walker, M. Thom and S. M. Sisodiya (2007). "Increased NKCC1 expression in refractory human epilepsy." *Epilepsy Research* **74**(2): 220-227.

Senior, T. J., J. R. Huxter, K. Allen, J. O'Neill and J. Csicsvari (2008). "Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus." *J Neurosci* **28**(9): 2274-2286.

Sik, A., M. Penttonen, A. Ylinen and G. Buzsaki (1995). "Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study." *J Neurosci* **15**(10): 6651-6665.

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." *Eur J Neurosci* **5**(12): 1719-1728.

Singer, W. and C. M. Gray (1995). "Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis." *Annu Rev Neurosci* **18**: 555-586.

Sivakumaran, S., R. A. Cardarelli, J. Maguire, M. R. Kelley, L. Silayeva, D. H. Morrow, J. Mukherjee, Y. E. Moore, R. J. Mather, M. E. Duggan, N. J. Brandon, J. Dunlop, S. Zicha, S. J. Moss and T. Z. Deeb (2015). "Selective inhibition of KCC2 leads to hyperexcitability and epileptiform discharges in hippocampal slices and in vivo." *J Neurosci* **35**(21): 8291-8296.

Sivakumaran, S. and J. Maguire (2016). "Bumetanide reduces seizure progression and the development of pharmacoresistant status epilepticus." *Epilepsia* **57**(2): 222-232.

Skaggs, W. E., B. L. McNaughton, M. A. Wilson and C. A. Barnes (1996). "Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences." *Hippocampus* **6**(2): 149-172.

Solstad, T., C. N. Boccara, E. Kropff, M. B. Moser and E. I. Moser (2008). "Representation of geometric borders in the entorhinal cortex." *Science* **322**(5909): 1865-1868.

Staley, K., R. Smith, J. Schaack, C. Wilcox and T. J. Jentsch (1996). "Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel." *Neuron* **17**(3): 543-551.

Stark, E., L. Roux, R. Eichler, Y. Senzai, S. Royer and G. Buzsaki (2014). "Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations." *Neuron* **83**(2): 467-480.

Stodberg, T., A. McTague, A. J. Ruiz, H. Hirata, J. Zhen, P. Long, I. Farabella, E. Meyer, A. Kawahara, G. Vassallo, S. M. Stivaros, M. K. Bjursell, H. Stranneheim, S. Tigerschiold, B. Persson, I. Bangash, K. Das, D. Hughes, N. Lesko, J. Lundeborg, R. C. Scott, A. Poduri, I. E. Scheffer, H. Smith, P. Gissen, S. Schorge, M. E. Reith, M. Topf, D. M. Kullmann, R. J. Harvey, A. Wedell and M. A. Kurian (2015). "Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures." *Nat Commun* **6**: 8038.

Szabadics, J., G. Tamas and I. Soltesz (2007). "Different transmitter transients underlie presynaptic cell type specificity of GABAA,slow and GABAA,fast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(37): 14831-14836.

Szabadics, J., C. Varga, G. Molnar, S. Olah, P. Barzo and G. Tamas (2006). "Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits." *Science* **311**(5758): 233-235.

Theodore, W. H., S. Bhatia, J. Hatta, S. Fazilat, C. DeCarli, S. Y. Bookheimer and W. D. Gaillard (1999). "Hippocampal atrophy, epilepsy duration, and febrile seizures in patients with partial seizures." *Neurology* **52**(1): 132-136.

Thomson, A. M., A. P. Bannister, D. I. Hughes and H. Pawelzik (2000). "Differential sensitivity to Zolpidem of IPSPs activated by morphologically identified CA1 interneurons in slices of rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **12**(2): 425-436.

Tollner, K., C. Brandt, T. Erker and W. Loscher (2015). "Bumetanide is not capable of terminating status epilepticus but enhances phenobarbital efficacy in different rat models." *Eur J Pharmacol* **746**: 78-88.

Tollner, K., C. Brandt, K. Romermann and W. Loscher (2015). "The organic anion transport inhibitor probenecid increases brain concentrations of the NKCC1 inhibitor bumetanide." *Eur J Pharmacol* **746**: 167-173.

Tollner, K., C. Brandt, M. Topfer, G. Brunhofer, T. Erker, M. Gabriel, P. W. Feit, J. Lindfors, K. Kaila and W. Loscher (2014). "A novel prodrug-based strategy to increase effects of bumetanide in epilepsy." *Ann Neurol* **75**(4): 550-562.

Traub, R. D. and R. K. Wong (1982). "Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy." *Science* **216**(4547): 745-747.

Tsubokawa, H. and W. N. Ross (1996). "IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca²⁺]_i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons." *J Neurophysiol* **76**(5): 2896-2906.

Tukker, J. J., P. Fuentealba, K. Hartwich, P. Somogyi and T. Klausberger (2007). "Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo." *J Neurosci* **27**(31): 8184-8189.

Tyzio, R., R. Cossart, I. Khalilov, M. Minlebaev, C. A. Hubner, A. Represa, Y. Ben-Ari and R. Khazipov (2006). "Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery." *Science* **314**(5806): 1788-1792.

Tyzio, R., M. Minlebaev, S. Rheims, A. Ivanov, I. Jorquera, G. L. Holmes, Y. Zilberter, Y. Ben-Ari and R. Khazipov (2008). "Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **27**(10): 2515-2528.

Tyzio, R., R. Nardou, D. C. Ferrari, T. Tsintsadze, A. Shahrokhi, S. Eftekhari, I. Khalilov, V. Tsintsadze, C. Brouchoud, G. Chazal, E. Lemonnier, N. Lozovaya, N. Burnashev and Y. Ben-Ari (2014). "Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring." *Science* **343**(6171): 675-679.

Valeeva, G., T. Tressard, M. Mukhtarov, A. Baude and R. Khazipov (2016). "An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons." *J Neurosci* **36**(22): 5961-5973.

van den Pol, A. N., K. Obrietan and G. Chen (1996). "Excitatory actions of GABA after neuronal trauma." *J Neurosci* **16**(13): 4283-4292.

Vibat, C. R., M. J. Holland, J. J. Kang, L. K. Putney and M. E. O'Donnell (2001). "Quantitation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction." *Anal Biochem* **298**(2): 218-230.

von der Malsburg, C. (1999). "The what and why of binding: the modeler's perspective." *Neuron* **24**(1): 95-104, 111-125.

Wang, C., C. Shimizu-Okabe, K. Watanabe, A. Okabe, H. Matsuzaki, T. Ogawa, N. Mori, A. Fukuda and K. Sato (2002). "Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain." *Brain Res Dev Brain Res* **139**(1): 59-66.

Wilson, M. A. and B. L. McNaughton (1993). "Dynamics of the hippocampal ensemble code for space." *Science* **261**(5124): 1055-1058.

Woo, N. S., J. Lu, R. England, R. McClellan, S. Dufour, D. B. Mount, A. Y. Deutch, D. M. Lovinger and E. Delpire (2002). "Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene." *Hippocampus* **12**(2): 258-268.

Yamasaki, M., M. Matsui and M. Watanabe (2010). "Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission." *J Neurosci* **30**(12): 4408-4418.

Ylinen, A., A. Bragin, Z. Nadasdy, G. Jando, I. Szabo, A. Sik and G. Buzsaki (1995). "Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms." *J Neurosci* **15**(1 Pt 1): 30-46.

Yuste, R. and T. Bonhoeffer (2001). "Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* **24**: 1071-1089.

Zhang, H., H. J. Cao, H. K. Kimelberg and M. Zhou (2011). "Volume regulated anion channel currents of rat hippocampal neurons and their contribution to oxygen-and-glucose deprivation induced neuronal death." *PLoS One* **6**(2): e16803.

Zhu, L., D. Lovinger and E. Delpire (2005). "Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride." *J Neurophysiol* **93**(3): 1557-1568.