

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I**

THESE DE DOCTORAT

**Spécialité :
NEUROSCIENCES**

**présentée par :
CLAIRE WYART**

**DYNAMIQUE DE L'ACTIVITE SPONTANEE
DANS DES RESEAUX DE NEURONES HIPPOCAMPIQUES
D'ARCHITECTURE CONTROLEE EN CULTURE**

JURY :

**Co-directeurs de Thèse: M. Didier Chatenay, M. Laurent Bourdieu
Rapporteur interne : M. Bernard Poulain
Rapporteur externe : M. Richard Miles
Rapporteur externe : M. Gwendal Lemasson
Examineur : M. Remy Schlichter
Examineur : Mme Anne Feltz
Membre invité : M. Nicolas Brunel**

**LABORATOIRE DE DYNAMIQUE DES FLUIDES COMPLEXES
UMR CNRS/ULP 7506, INSTITUT DE PHYSIQUE,
3 RUE DE L'UNIVERSITE, 67084 STRASBOURG**

Remerciements

Les personnes qui m'ont soutenue ou aidée pendant ma thèse sont nombreuses et j'espère être juste et n'oublier personne. D'abord je souhaite remercier les membres de mon jury, et en tant que rapporteurs Gwendal Lemasson, Richard Miles et Bernard Poulain pour leur travail approfondi. Ces derniers ainsi que Rémy Schlichter et Anne Feltz se sont montrés en outre pendant ma thèse disponibles pour discuter et ont par leurs questions et leurs conseils fait avancé l'interprétation de mes résultats expérimentaux. Je leurs en suis très reconnaissante. Bernard Poulain en particulier a véritablement contribué à l'aboutissement de ce travail par ses remarques précieuses sur les mécanismes de la maintenance et ses critiques sur la présentation initiale des données des réseaux pluricellulaires dans mon manuscrit préliminaire. Je remercie aussi le théoricien Nicolas Brunel d'avoir corrigé avec soin mon manuscrit et d'avoir été présent à ma soutenance.

Je tiens à remercier ensuite mes directeurs de thèse, Didier Chatenay et Laurent Bourdieu qui ont joué des rôles précieux et complémentaires dans l'encadrement de mon travail. Grâce à eux, j'ai travaillé avec plusieurs idées simples mais essentielles : *i)* on ne travaille bien qu'en s'amusant ; *ii)* si on est prêt à se retrousser les manches et à se lancer, tout est possible ; *iii)* on reste humble par rapport à son travail, ses efforts et l'apport que l'on a fourni. Ils m'ont permis de développer mon travail avec beaucoup de liberté et de m'exprimer même quand on n'était pas d'accord. Leurs remarques spontanées, franches et souvent profondément optimistes m'ont beaucoup appris et m'ont fait réfléchir sur mes positions. Au cours des soirées, des week ends ou des vacances estivales un peu tristes où le laboratoire était déserté, mes discussions avec Didier étaient la seule source de vie et de bonne humeur. Un jour râleur, un jour gai, toujours intègre, sincère, passionné et sensible. Merci d'avoir été si présent.

Dans le laboratoire, chaque étudiant a un sujet indépendant du reste du groupe. Néanmoins tout au long de ma thèse, mon travail n'aurait pu s'accomplir sans le soutien de l'équipe de biophysique : particulièrement Catherine Herr, Rémi Salomé, Jean François Léger et Jérôme Robert. Je suis très reconnaissante à l'ensemble des personnes qui ont contribué au développement de la technique des réseaux. Ce travail a commencé avec Didier à Rockefeller en 1997 qui a appris la culture et a commencé à reproduire les protocoles initiaux de lithographie qui permettaient concrètement seulement un contrôle de l'adhésion de cellules non excitables. De retour en France, Laurent d'abord seul puis avec le soutien efficace, persistant et minutieux de Catherine Herr a mis en route les cultures à Strasbourg et recommencé la lithographie. En 1998-9, Christophe Ybert, ATER au laboratoire, a eu l'idée d'utiliser un générateur de plasma pour nettoyer les surfaces des silanes. En travaillant en équipe avec Catherine et Laurent, puis avec l'aide de Christelle Prinz, ils ont obtenu les premiers motifs de réseaux d'architecture contrôlée vers mai 1999.

J'étais alors déjà dans la cave du laboratoire réalisant un projet de DEA sur la diffusion de protéines chimères GFP dans des neurones d'hippocampe mesurée par spectroscopie de corrélation de fluorescence. J'ai eu le sentiment que j'apprendrais beaucoup dans cet environnement de physiciens qui maîtrisaient de nombreuses techniques et n'hésitaient pas à monter une nouvelle manip en un jour. Laurent et Christophe essayaient alors de patcher les neurones des réseaux mais sans grand succès. Cette histoire de réseaux de neurones dont l'architecture était contrôlée *in vitro* était une drôle d'idée¹ mais je me suis laissée tentée.

¹ je ne voyais pas bien ce qu'apporterait de contrôler physiquement la position des corps cellulaires et des neurites pour un réseau de neurones.

Ainsi je suis restée d'abord tout l'été pour mettre au point la fabrication des pipettes, et patcher ces satanées cellules. La première année de ma thèse, Catherine a consacré beaucoup de temps pour me former aux techniques de culture primaire. C'est en travaillant coude à coude avec elle et Laurent, que nous avons optimisé les conditions de culture et de lithographie afin que la physiologie des neurones soit conservée. Cette année a été la plus dure mais aussi la plus intense de ma thèse. Les cultures ne marchaient pas souvent, et point qui peut sembler absurde : je ne savais toujours pas bien ce que je ferais si enfin la technique marchait.

Pendant cette année là, j'ai dû mettre en œuvre et installer de nombreuses techniques (patch, immunocytochimie des synapses et des neurones inhibiteurs, imagerie calcique et time lapse). Je n'aurais pas pu monter de poste de double patch et d'imagerie sans l'aide d'Alain Steyer et de Patrick Braun pour l'usinage des pièces de mécanique, de Marc Basler pour l'électronique. Je pense que je n'aurais peut être pas encore fini ma thèse sans l'aide efficace et sympathique de Nadia pour traiter les commandes au plus vite.

Puis la lithographie a fini par marcher de façon robuste et systématique. L'idée naturelle émise par Laurent et Didier a été de voir si les neurones étaient spontanément actifs, et si oui, d'analyser la dynamique qu'ils généreraient. Nous avons commencé avec le patch et l'imagerie calcique à voir que les cellules formaient des bouffées collectives séparées par de longs silences indépendamment du nombre de cellules. Mais cela n'était pas clair de comprendre pourquoi la dynamique différait pour un même nombre de cellules d'un réseau à l'autre. Je suis repartie faire des expériences d'immunocytochimie dans le laboratoire de MJ Freund Mercier pour établir un lien entre la dynamique et la proportion de neurones inhibiteurs.

A cette période, Simona Cocco est arrivée au laboratoire et a travaillé sur l'analyse de l'activité des réseaux de neurones. Ensemble en 2002, nous avons passé beaucoup de temps à regarder, comprendre et analyser les données d'imagerie calcique des réseaux. Entre autres, elle a mis au point le programme qui a permis la détection simultanée des potentiels d'action des neurones à partir du signal du Fura-2. Cette tâche était rendue très pénible par les problèmes de saturation de la sonde, et de synchronisation de l'imagerie et du patch clamp. Notre travail a commencé ainsi et s'est prolongé l'année suivante avec l'analyse de l'activité spontanée des autapses qui a demandé aussi beaucoup d'efforts.

Durant l'été 2002, Oleg Krichevsky (anciennement post doc au laboratoire) a travaillé avec moi jours et nuits pour analyser les corrélations d'activité des neurones dans les réseaux. A la fin de ma thèse, Jean François Léger m'a beaucoup aidée pour l'analyse fine et la présentation de mes résultats sur les autapses et les réseaux.

A plusieurs occasions, j'ai été faire des expériences à l'extérieur du L.D.F.C. Dans le laboratoire dirigé par Marie José Freund Mercier, j'ai bénéficié des conseils utiles de Sylvain Hugel et de Rémy Schlichter pour l'électrophysiologie, de Lise Stoeckel pour l'immunocytochimie, et de Emmanuel Jover pour les expériences en time lapse. J'ai encadré avec plaisir plusieurs stagiaires qui ont travaillé avec énergie et bonne humeur (Elaine, Pascale, Nicolas, Carine, Yannick et Baptiste).

C'est grâce à Gérard Guillaume que j'ai ri un paquet de fois lors de mes pauses café-éclair, et que la version préliminaire de la thèse a été imprimée. Je remercie enfin mes amis de l'institut (Adrian, Alain, Alex, Luis, Mike, Nadia, Rémi) et d'autres amis très chers (Adrian, Alex, Déborah, Frédéric, Franck, Marc, Pauline, Peggy, Sigolène). Une pensée particulière pour les manouches clodoaldiens, les SPS 2 ainsi que le coq, la tortue et le mouton qui peut être se reconnaîtront.

Table des matières

INTRODUCTION	7
1. Les rôles possibles de l'activité spontanée.....	8
1.1. Lors du développement.....	8
1.1.1. Dans la rétine	9
1.1.2. Dans la moelle épinière.....	9
1.1.3. Dans l'hippocampe.....	9
1.2. Importance dans le codage de l'information chez l'adulte.....	10
1.2.1. Du bruit stochastique ?.....	10
1.2.2. A l'origine de la grande variabilité des réponses évoquées dans le cortex sensoriel	11
1.2.3. Des motifs communs dans l'activité collective spontanée et évoquée	12
2. Les motifs de l'activité spontanée.....	13
2.1. Vagues et oscillations lors du développement.....	13
2.1.1. Dans la rétine	14
2.1.2. Dans la moelle épinière.....	14
2.1.3. Dans l'hippocampe.....	15
2.2. Une activité plus diversifiée et complexe chez l'adulte	17
2.2.1. Dans le thalamus	17
2.2.2. Les états "UP" et "DOWN" du cortex	18
2.2.3. Décharges complexes des cellules pyramidales et interneurons de l'hippocampe	19
3. Contrôle de la dynamique de l'activité spontanée.....	20
3.1. Réseaux immatures	20
3.1.1. Un contrôle par l'excitation récurrente	20
3.1.2. Arrêt et périodicité sous contrôle de la dépression du réseau.....	22
3.1.3. Homéostasie dans les circuits immatures.....	23
3.2. Dans les réseaux matures	24
3.2.1. Cellules à la décharge autonome.....	24
3.2.2. Des circuits locaux d'inhibition	24
3.2.3. Une régulation de la balance excitation / inhibition de l'activité corticale	25
3.2.4. Interaction entre les propriétés intrinsèques des cellules et les circuits locaux d'excitation / inhibition.....	26
4. De l'approche en culture.....	28
4.1. Objectifs.....	28
4.2. Les limitations expérimentales des préparations classiques.....	28
4.3. Les caractéristiques des neurones en culture en conditions définies.....	29
4.4. Intérêts et limites de l'approche en culture	31
4.4.1 Intérêts.....	31
4.4.2. Limites	31
4.4.3. Dans le but de suivre l'activité spontanée de réseaux de neurones	32
4.5. Des réseaux d'architecture contrôlée in vitro.....	32
I. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DES RESEAUX DE NEURONES BIOLOGIQUES.....	35
I.1. Principe.....	35
I.2. Développement du protocole.....	35
I.3. Réalisation du protocole	36
I.4. Caractérisation des propriétés des neurones en réseaux d'architecture contrôlée.....	37
II. METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE SPONTANEE ET DE DETECTION DES NEURONES INHIBITEURS	52
II.1. Estimation des potentiels d'action par la technique de patch clamp en configuration cellule attachée.....	53
II.1.1 Principe : une mesure extracellulaire.....	53
II.1.2. La mesure proportionnelle au potentiel de membrane ou à sa dérivée.....	53
II.1.2.1. Pour des signaux de fréquence $\nu \gg \nu_m = 40\text{Hz}$	55
II.1.2.2. Pour des signaux de fréquence $f \ll \nu_m = 40\text{Hz}$	56
II.1.3. Calcul du signal mesuré en mode Voltage Clamp.....	56
II.1.3.1. Pour un potentiel d'action.....	56
II.1.3.2. Pour un EPSP autaptique dans une cellule mature	56
II.1.4. Comparaison avec les mesures expérimentales	57
II.1.5. Seuil minimal de détection de l'autapse	57
II.1.6. Avantages et limites de la technique	58
II.2. Estimation des potentiels d'action et mesure des variations de concentration du calcium intracellulaire par imagerie de fluorescence avec la sonde Fura 2 AM.....	58

II.2.1. Les propriétés des sondes	59
II.2.1.1. Affinité et caractéristiques spectrales de la sonde	59
II.2.1.2. Chargement du cytosol des cellules en sonde fluorescente	60
II.2.1.3. Calibration	61
II.2.1.4. Perturbation de l'homéostasie calcique	61
II.2.2. De la mesure d'intensité de fluorescence dans le corps cellulaire à la concentration en calcium libre.	62
II.2.2.1. L'intensité du signal de fluorescence renseigne sur la quantité de calcium liée à la sonde	62
II.2.2.2. Mesure des flux entrant de calcium	63
II.2.2.3. Equation décrivant un transitoire de calcium suite à un potentiel d'action.	64
II.2.2.4. Effets de l'application d'une sonde de constante de liaison $\kappa_F = [F]_T / K_d$	64
II.2.2.5. Estimation de l'amplitude A de la variation de concentration du calcium libre lors d'un transitoire calcique	66
II.2.2.6. Sommation de transitoires successifs lors d'une bouffée de potentiels d'action.	68
II.2.2.7. Estimation du timing des potentiels d'action	69
II.3. Détection des neurones inhibiteurs par immunocytochimie dirigée contre le GABA et la GAD 65	72
II.3.1. Protocole d'immunocytochimie	72
II.3.1.1. Anticorps	72
II.3.1.2. Immunocytochimie	72
II.3.2. Un marquage caractéristique des neurones inhibiteurs	72
II.3.3. Confirmation par l'électrophysiologie : une signature caractéristique dans les enregistrements en configuration cellule attachée	74
III. INITIATION ET MAINTENANCE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE DANS LES RESEAUX EXCITATEURS ISOLES in vitro	75
III.1. Initiation et maintenance sont des phénomènes indépendants	76
III.1.1. Des bouffées caractéristiques dans les réseaux excitateurs	76
III.1.2. Similarité de l'activité spontanée et persistante	79
III.2. L'initiation de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs requiert le bruit synaptique	80
III.2.1. Dans les autapses glutamatergiques	80
III.2.2. Dans les réseaux glutamatergiques	82
III.3. Maintenance de l'activité électrique	86
III.3.1. Dans les réseaux excitateurs ultra-synchrones (autapses)	86
III.3.1.1. Persistance à basse fréquence	87
III.3.1.2. Persistance à très basse fréquence	88
III.3.2. Pour les hétérosynapses dans des réseaux pluricellulaires	91
III.3.3. Dans les réseaux pluricellulaires	95
IV. STRUCTURE FONCTIONNELLE DES RESEAUX ET DYNAMIQUE DE L'ACTIVITE SPONTANEE	98
IV.1. Définition de la structure fonctionnelle d'un réseau de neurones d'architecture contrôlée	100
IV.1.1. Nombre total de neurones	100
IV.1.2. Nature des neurones	100
IV.1.3. Connectivité et géométrie	100
IV.2. Propriétés individuelles des neurones excitateurs	104
IV.2.1. Profils de décharge des neurones	104
IV.2.1.1. La décharge des neurones est similaire dans tous les réseaux excitateurs	104
IV.2.1.2. Effet du nombre total de neurones sur la décharge des neurones excitateurs	105
IV.2.1.3. Diversification des profils de décharge dans les réseaux avec un neurone inhibiteur	105
IV.2.2. Niveau d'activité des neurones	109
IV.2.2.1. Croissant avec le nombre de neurones dans les réseaux excitateurs	109
IV.2.2.2. Activité modérée des neurones excitateurs voisins du neurone inhibiteur	109
IV.2.2.3. Pas de modération de l'activation globale des neurones excitateurs distants du neurone inhibiteur ...	110
IV.2.3. Durée des bouffées de potentiels d'action collectives	110
IV.2.3.1. Croissante avec le nombre de neurones excitateurs	110
IV.2.3.2. Effets variables des neurones inhibiteurs	110
IV.3. Dynamique collective des neurones excitateurs	113
IV.3.1. Etats d'activation des réseaux	113
IV.3.1.1. Un état d'activation unique dans les réseaux excitateurs comportant au plus 7 neurones	113
IV.3.1.2. Etats d'activation multiples dans les réseaux avec un neurone inhibiteur	113
IV.3.2. Niveau de synchronisation moyen	115
IV.3.2.1. Diminution avec le nombre total de neurones excitateurs	115
IV.3.2.2. Effets des neurones inhibiteurs	116
IV.3.3. Assemblées de neurones synchrones	117

IV.3.3.1. Emergence avec le nombre croissant de neurones excitateurs dans un réseau.....	117
IV.3.3.2. Constitution fondée sur la connectivité entre neurones excitateurs	118
IV.3.3.3. Segmentation des assemblées de neurones synchrones accentuée par les neurones inhibiteurs	120
DISCUSSION	126
1. De l'approche des réseaux de neurones d'architecture contrôlée.....	126
1.1. Intérêts majeurs de la technique.....	126
1.1.1. Simplicité d'obtention et reproductibilité.....	126
1.1.2. Un outil pour les études sur le développement.....	127
1.2. Développement des neurones dans les réseaux d'architecture contrôlée.....	129
1.2.1. Morphogénèse.....	129
1.2.2. Synaptogénèse.....	129
1.2.3. Libération spontanée de glutamate.....	131
2. Mécanismes synaptiques mis en jeu dans l'initiation et la maintenance de l'activité spontanée des réseaux excitateurs	132
2.1. La libération spontanée de glutamate est nécessaire à l'initiation de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs	132
2.1.1. Autapses.....	132
2.1.2 Réseaux	132
2.2. Mécanismes de maintenance de l'activité spontanée sous forme de bouffées	133
2.2.1. Cellule glutamatergique isolée : Rôle des différentes composantes synaptiques dans la maintenance de l'activité	133
2.2.3. Mécanismes synaptiques et de réseaux dans les réseaux pluricellulaires.....	139
3. Lien entre l'architecture fonctionnelle d'un réseau et les motifs de l'activité spontanée qu'il génère.....	140
3.1. Les oscillations synchrones : le motif commun de l'excitation récurrente.....	140
3.2. Emergence d'assemblées de neurones glutamatergiques synchrones	141
3.3. Circuits d'inhibition locaux.....	141
3.3.1. Inhibition récurrente disynaptique	142
3.3.2. Contrôle des assemblées synchrones par des neurones GABAergiques	142
3.3.3. Contrôle global par les inhibiteurs	143
4. Règles opérant pendant le développement	144
4.1. Connectivité de proximité.....	144
4.2. Homéostasie.....	144
CONCLUSIONS.....	146
ANNEXE 1	147
ANNEXE 2	154
BIBLIOGRAPHIE	160

RESUME

De l'activité électrique spontanée est observée dans de nombreuses structures cérébrales. Elle pourrait intervenir avant l'expérience sensorielle dans la formation des patrons de connexions des réseaux immatures, et chez l'adulte dans le traitement de l'information sensorielle. La contribution des mécanismes synaptiques et des propriétés de réseaux dans la dynamique de l'activité spontanée est difficile à déterminer dans les préparations classiques où l'activité et la connectivité ne sont être connues pour plus de deux neurones. Dans ces systèmes, les relations entre l'architecture fonctionnelle des réseaux neuronaux et la dynamique de leur activité spontanée ne peuvent pas non plus être déterminées. C'est pour explorer les mécanismes d'initiation et de persistance et le rôle de l'architecture fonctionnelle dans l'activité spontanée que nous avons mis au point une approche de culture où l'architecture des réseaux de neurones hippocampiques est contrôlée par traitement des surfaces d'adhésion (Chapitre I). Cette approche permet de produire des réseaux dont l'architecture est définie par le nombre total et la position des neurones.

L'activité spontanée a été mesurée par la technique de patch clamp en configuration cellule attachée qui permet de suivre l'activité d'un ou deux neurones avec une résolution inférieure à 1ms, et en imagerie de fluorescence avec la sonde Fura-2 liant le calcium (et qui pénètre dans les cellules sous sa forme AM), qui permet de suivre l'activité de tous les neurones d'un réseau simultanément avec une résolution de 50ms (Chapitre II).

Dans le Chapitre III, j'ai montré que la libération spontanée de glutamate aux synapses permet l'initiation de l'activité spontanée dans des réseaux de neurones glutamatergiques en culture. Le premier potentiel d'action d'une bouffée est déclenché par un événement miniature (mEPSP) de grande amplitude ou par sommation d'évènements multiples. La persistance de l'activité à basse fréquence dans le modèle de réseau excitateur ultra-synchrone qu'est l'autapse glutamatergique repose sur des composantes synaptiques lentes. Le récepteur NMDA, une lente dépolarisation dépendant du calcium résiduel (assimilé à I CAN) et la libération asynchrone de glutamate contribuent au maintien de l'activité à basse fréquence. Dans les réseaux pluricellulaires, le maintien de l'activité est permis par des composantes synaptiques lentes et des mécanismes de réverbération de l'excitation.

La structure fonctionnelle d'un réseau est définie par le nombre de neurones, la présence de neurones inhibiteurs et la distance entre neurones qui est associée à une probabilité de connectivité moyenne. Nous avons cherché l'incidence de ces 3 paramètres sur plusieurs aspects de la dynamique de l'activité spontanée (Chapitre IV). Un réseau de neurones purement excitateur n'exprime que des bouffées de potentiels d'action séparées qui sont synchrones pour tous les neurones du réseau. En revanche, les profils de décharge des neurones et les états d'activation macroscopiques du réseau deviennent complexes en présence de neurones inhibiteurs. Dans les réseaux comprenant un neurone inhibiteur au moins, les assemblées de neurones synchrones sont constituées par des neurones excitateurs fortement connectés et se ségréguent grâce aux neurones GABAergiques. Les neurones GABAergiques ont donc plusieurs actions sur l'activité des neurones glutamatergiques : à l'échelle du réseau, ils diminuent le niveau d'activité et la "synchronisation" globale des neurones excitateurs ; localement, ils entraînent une segmentation des assemblées de neurones synchrones.

En conclusion, nous avons pu grâce aux réseaux de neurones d'architecture contrôlée décrire de nouveaux mécanismes déterminant la dynamique de l'activité spontanée. Ces petits réseaux constituent un nouvel outil d'étude des mécanismes reliant activité électrique et développement. Le couplage réussi de la lithographie avec les multi-électrodes (Multi-Electrodes Arrays, MEAs) permet d'envisager prochainement l'enregistrement d'unités uniques avec une bonne résolution temporelle et sur plusieurs semaines *in vitro*.

INTRODUCTION

A l'échelle d'un réseau de neurones, l'activité spontanée peut être définie comme l'activité électrique en absence d'entrées. Cette définition présuppose la caractérisation d'un réseau de neurones isolé et une connaissance de toutes les entrées de ce réseau, ce qui est difficile à déterminer pour une structure dans le cerveau. L'activité spontanée dans le cerveau est donc définie par rapport aux stimuli extérieurs. Lors des phases précoces du développement, on parle d'activité spontanée avant l'apparition d'expériences sensorielles. Dans le cerveau adulte, l'activité spontanée fait référence *i)* à l'activité électrique observée pendant le sommeil ou chez l'animal anesthésié, dans les structures qui ne reçoivent pas alors de stimulations sensorielles, ou *ii)* à l'activité électrique qui, pendant l'éveil, dans les aires sensorielles ou motrices par exemple, ne montre pas de corrélation avec la perception sensorielle ou avec la réalisation d'une tâche motrice.

Je vais présenter d'abord les fonctions potentielles de l'activité spontanée lors du développement avant l'apparition des premières expériences sensorielles, et dans le codage de l'information chez l'adulte, dans le cerveau des vertébrés. Je présenterai ensuite les caractéristiques de la dynamique de l'activité spontanée dans différentes structures du système nerveux de vertébrés, lors du développement et chez l'adulte. Dans des exemples tirés de ces structures, je montrerai les interactions entre les mécanismes cellulaires, synaptiques et des propriétés de réseaux qui rendent compte de l'initiation et de la maintenance de l'activité spontanée. Je chercherai à établir, dans le cerveau immature et le cerveau adulte, des relations entre l'architecture des réseaux et les dynamiques de l'activité spontanée qu'ils génèrent. Je vais ensuite considérer les limitations techniques rencontrées dans les approches classiques des préparations entières ou isolées *in vitro*, et décrire l'approche de la culture primaire de neurones qui constitue un modèle intermédiaire entre les réseaux matures et immatures. Les intérêts et les limites de la culture ont motivé le développement de la technique des réseaux d'architecture contrôlée.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé des réseaux de neurones hippocampiques à architecture variable dans le but *i)* de caractériser les mécanismes synaptiques et les propriétés de réseaux qui permettent que l'activité spontanée soit générée puis maintenue pendant plusieurs secondes et *ii)* de dégager les relations entre l'architecture fonctionnelle et l'organisation spatio-temporelle de l'activité. Je définirai dès maintenant quelques concepts qui vont aider la compréhension de l'exposé suivant. Le terme d'*architecture fonctionnelle d'un réseau* sera utilisé pour décrire l'organisation d'un réseau caractérisé par le nombre total

de neurones, leur nature (glutamatergique / GABAergique) et leur connectivité. Les *profils de décharge* seront classés en fonction de l'expression de potentiels d'action isolés, de bouffées de potentiels d'action et de silence. L'*état d'activation d'un réseau* qualifiera la représentation spatiale de l'activation macroscopique d'un même réseau. Une *assemblée de neurones synchrones* désignera un ensemble de neurones dont l'activité est fortement corrélée.

1. Les rôles possibles de l'activité spontanée

L'activité spontanée pourrait être un épiphénomène résultant du circuit de neurones sous jacent, dépourvu de rôles particuliers. Nous allons voir en quoi l'activité spontanée dans le cerveau semble au contraire jouer des rôles importants dans la formation des réseaux de neurones au cours du développement et être un paramètre important pour analyser le codage de l'information chez l'adulte, dans le cerveau des vertébrés.

1.1. Lors du développement

Les connexions initiales qui définissent les circuits neuronaux à l'origine du système nerveux semblent déterminées en grande part par un programme génétique. Ainsi, dans les premières étapes du développement du système nerveux, la mise en place des réseaux ne dépend pas de l'activité électrique des neurones mais de l'expression d'une grande variété de molécules de guidage (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Après la naissance, avec les premières expériences sensorielles lors d'une période dite critique, il a été démontré que l'activité électrique des neurones évoquée par l'expérience sensorielle est cruciale pour la mise en place des contacts synaptiques, la maturation des synapses, et l'affinage de la connectivité au sein de ces réseaux de neurones (Shatz, 1992; Katz and Shatz, 1996; Shatz, 1997; Zhang and Poo, 2001).

Cependant il semble qu'avant même les premières expériences sensorielles, les connexions entre neurones montrent déjà un degré élevé d'organisation (en particulier chez les primates (Wiesel and Hubel, 1974)). A ce stade, les neurones sont spontanément actifs dans de nombreuses structures du système nerveux telles que la rétine (Wong et al., 1993), le thalamus (Weliky and Katz, 1999), l'hippocampe (Khazipov et al., 2001) et dans la moelle épinière (Provine, 1972). Sachant que l'activité électrique évoquée par les premières expériences sensorielles joue un rôle crucial dans le développement du cerveau, il a été proposé que cette activité électrique, avant les premières expériences sensorielles, puisse jouer

un rôle dans le développement des réseaux neuronaux, en permettant en particulier au sein d'une région donnée leur maturation fonctionnelle (Goodman and Shatz, 1993).

1.1.1. Dans la rétine

Dans la rétine, avant la vision, une activité périodique avec des bouffées de potentiels d'action est émise par les cellules ganglionnaires et se propage de proche en proche sous forme d'une vague lente (Wong et al., 1993). L'activité a lieu au niveau de la couche des cellules ganglionnaires pendant la période critique. A ce stade, leurs axones établissent finement leurs connexions au niveau du noyau latéral géniculé dans le thalamus où s'opère une ségrégation en couches des connexions établies par les axones provenant de chaque œil. Chez le furet, la suppression des vagues de potentiels d'action des cellules ganglionnaires de la rétine dans un seul œil au stade prénatal conduit, au niveau du noyau géniculé latéral, à une réduction des territoires correspondant à cet œil et une expansion des territoires de l'autre œil (Penn et al., 1998). L'activité spontanée endogène des cellules ganglionnaires est donc nécessaire pour que leurs connexions s'organisent de façon spécifique pour chaque œil au niveau du thalamus. Elle pourrait constituer ainsi le support nécessaire à la compétition interoculaire avant la vision.

1.1.2. Dans la moelle épinière

Des enregistrements extracellulaires dans l'embryon de poulet *in ovo* montrent que l'activité apparaît dans la moelle épinière sous forme de bouffées périodiques et synchronisées entre les différents segments (Provine, 1972). Cette activité spontanée et rythmique a lieu entre les stades E4 et E11 précisément lorsque les axones des motoneurones cherchent leur chemin vers le plexus et innervent les muscles squelettiques (O'Donovan et al., 1998).

1.1.3. Dans l'hippocampe

On observe de l'activité spontanée dans l'hippocampe *in utero* chez le singe (Khazipov et al., 2001) et *in vivo* chez le rat au début du développement post natal (Leinekugel et al., 2002). Cette activité apparaît sous forme de bouffées de potentiels d'action durant quelques secondes. Une activité similaire a été observée *in vitro* sous forme de grandes dépolarisations périodiques de 25 à 50mV d'amplitude. Elles sont désignées sous le terme de GDPs (Giant Depolarising Potentials) (Ben-Ari et al., 1989) ou de ENOs (Early Network Oscillations) et sont associées à des transitoires calciques (Garaschuk et al., 1998). Lors d'une oscillation, des

trains de potentiels d'action à haute fréquence apparaissent sur une vague massive dépolarisante. Ils peuvent être enregistrés dès les premiers jours après la naissance (entre P1 et P15) dans les régions CA1 de l'hippocampe et concernent probablement tout l'hippocampe (Garaschuk et al., 1998). Le rôle des oscillations synchrones de la concentration en calcium dans le cytosol des cellules hippocampiques n'a pas encore été élucidé. Néanmoins elles ont lieu à une étape du développement où la plupart des connexions se mettent en place. Le caractère collectif et vaste de cette activité pourrait sous tendre une organisation à grande échelle de la connectivité entre neurones hippocampiques.

Conclusion

La dynamique de l'activité spontanée est présente dans plusieurs structures nerveuses au cours du développement et partage des motifs communs : elle a lieu sous la forme de bouffées de potentiels d'action séparées par des périodes de silence. L'état d'activation du réseau est global : soit sous forme de vagues qui se propagent dans toute la structure, soit sous forme d'oscillations synchrones. Il y a encore peu d'exemples illustrant les rôles de l'activité spontanée dans le développement (Penn et al., 1998). Néanmoins puisqu'elle apparaît lors de périodes décisives pour la mise en place des connexions, il a été proposé qu'elle façonne l'architecture des réseaux. Cette activité spontanée est toujours associée à des transitoires de calcium qui pourraient être impliqués dans la spécification des phénotypes cellulaires, l'activation d'enzymes, et l'expression génétique.

1.2. Importance dans le codage de l'information chez l'adulte

1.2.1. Du bruit stochastique ?

L'analyse d'enregistrements unitaires dans le cortex visuel primaire V1 et extrastrié MT montre que les neurones de V1 et MT déchargent *individuellement* de manière aléatoire (Softky and Koch, 1993). De ce fait, les études *in vivo* qui visent à caractériser l'activité évoquée par une stimulation sensorielle ou générée lors d'une tâche motrice ou comportementale, considèrent généralement que l'activité spontanée est un processus stochastique. L'activité unitaire stochastique est implicitement considérée comme non corrélée entre neurones d'une même région et l'approche commune suppose que la réponse du cortex à une stimulation est la somme d'un signal évoqué reproductible et de ce bruit non

corrélé. Cette hypothèse justifie le moyennage de l'activité de population de neurones d'un essai à l'autre lors de stimulations répétées afin d'augmenter la signature du signal évoqué.

Cependant pour démontrer que ce bruit est aléatoire, il faut s'assurer qu'il n'existe pas de corrélation de l'activité entre neurones. Et si l'activité de neurones unitaires peut paraître stochastique, il est possible qu'il existe, même dans l'activité spontanée, des corrélations entre les décharges de neurones d'une même région. Mettre en évidence des corrélations d'activité entre neurones requiert de mesurer l'activité de population de neurones. Nous allons voir que les approches couplées d'enregistrements unitaires et de mesure de l'activité de population suggèrent en effet qu'il existe des corrélations entre neurones dans l'activité spontanée du cortex.

1.2.2. A l'origine de la grande variabilité des réponses évoquées dans le cortex sensoriel

La réponse évoquée d'une région du cortex montre une grande variabilité quand un stimulus est présenté de façon répétée. Cette variabilité est souvent aussi grande que la réponse elle-même dans l'animal anesthésié (Schiller et al., 1976; Scobey and Gabor, 1989) ou en train de remplir une tâche (Vogels et al., 1989; Softky and Koch, 1993). Arieli et coll. ont analysé l'activité de populations de neurones dans le cortex visuel primaire du chat (aires 17 et 18) soit spontanée, soit évoquée par des stimulations visuelles successives (Arieli et al., 1996; Kenet et al., 2003). Pour chaque type d'activité, ils ont évalué l'activité du réseau en couplant deux approches :

- i)* Une mesure par imagerie optique en temps réel avec des sondes sensibles au potentiel. Cette mesure sensible aux variations du potentiel de membrane des prolongements des neurones reflète les entrées synaptiques.
- ii)* Une mesure du potentiel de champ local qui révèle l'activité de populations de neurones.

Ils montrent que l'activité évoquée de population de neurones dépend grandement de leur activité initiale spontanée. La dynamique de l'activité spontanée suffit à expliquer la grande variabilité des réponses à une stimulation sensorielle si bien que les réponses évoquées lors d'essais individuels peuvent se déduire de la sommation linéaire de la réponse évoquée moyennée et de l'activité spontanée qui précède la stimulation. Ainsi l'activité spontanée pourrait constituer une part non négligeable de la réponse évoquée instantanée à laquelle le cerveau doit répondre sans moyennage. Arieli et coll. propose qu'au lieu d'être un bruit nuisible pour le traitement de l'information dans le cerveau comme ce qui était supposé, cette

activité pourrait refléter un état du cortex et être critique pour son fonctionnement (Arieli et al., 1996; Tsodyks et al., 1999; Kenet et al., 2003).

1.2.3. Des motifs communs dans l'activité collective spontanée et évoquée

Depuis ce travail, Tsodyks et coll. ont analysé, dans les mêmes aires du cortex visuel primaire du chat, les corrélations qui existent entre la décharge d'un neurone et l'activation de la population de neurones de la région dans laquelle il se trouve (Tsodyks et al., 1999). Ils montrent que l'activité du neurone enregistré est fortement corrélée avec l'état d'activation optimale de cette région. L'état d'activation optimale est défini lorsque le neurone enregistré décharge et correspond à une organisation spatio-temporelle de l'activité qui reflète la structure fonctionnelle du cortex, organisée sous forme de colonnes d'orientation dans ces aires.

Ils comparent ensuite les états d'activation de la région qui sont fortement corrélés avec l'activité du neurone, en présence (état d'activation évoqué, obtenu après moyennage) ou en absence (état d'activation spontané) de stimulations visuelles. Ils montrent que les états spontanés et évoqués sont très similaires. Cette concordance suggère que motifs évoqués et spontanés reflètent chacun la structure fonctionnelle du cortex sous jacent. Ils proposent que l'activation de la région par une stimulation visuelle, à l'origine de l'état d'activation évoqué, ne fasse qu'éveiller un état d'activation exprimé spontanément par la région et déterminé par son architecture fonctionnelle.

Conclusion

Lors du développement du cerveau chez les vertébrés, l'activité spontanée qui apparaît avant toute expérience sensorielle pourrait permettre de façonner l'architecture des réseaux neuronaux immatures au sein de différentes structures. Chez l'adulte, l'activité spontanée de population de neurones au niveau des colonnes d'orientation du cortex visuel primaire constitue une part importante de la réponse évoquée. Elle pourrait refléter l'architecture fonctionnelle du réseau sous jacent et rendre compte d'un état intrinsèque du cortex.

Plusieurs questions axées sur la compréhension de la dynamique de l'activité spontanée ont orienté mon travail.

- 1) Quels sont les mécanismes cellulaires, synaptiques ou les propriétés de réseaux à l'origine de l'*initiation* de cette activité ? Nous allons voir par la suite que plusieurs travaux en tranches ont montré que des cellules déchargent de façon autonome. La question se pose de savoir si elles sont à l'origine de l'activité spontanée, et si

l'initiation d'une activité de réseau spontanée ne peut avoir lieu qu'après l'activation de ces cellules autonomes. Des mécanismes synaptiques, tels que la libération spontanée de glutamate, pourraient peut être aussi initier localement de l'activité spontanée.

- 2) Comment l'activité, une fois initiée, peut-elle se *maintenir* dans un réseau qui ne reçoit pas de stimuli de l'extérieur ? L'activité spontanée se maintient souvent pendant plusieurs secondes dans des cellules individuelles. Une fois l'activité initiée dans une cellule, elle peut se propager au reste du réseau. Plusieurs mécanismes peuvent assurer la maintenance de l'activité : la propagation de l'excitation dans des boucles récurrentes (réverbération de l'excitation) ou bien l'activation peut se maintenir dans les cellules elles-mêmes grâce aux propriétés des synapses.
- 3) Dans quelle mesure cette activité reflète-t-elle l'architecture fonctionnelle du réseau sous-jacent ? Cette question est soulevée par les expériences *in vivo* où l'on observe un nombre fini d'états d'activation propres à une région donnée (Tsodyks et al., 1999; Kenet et al., 2003). L'architecture locale d'un réseau de neurones pourrait être à l'origine de différents états d'activation sous contrôle de modulateurs tels que l'attention, les émotions etc.

Nous allons considérer ce qui est connu à partir des expériences réalisées dans les modèles mammifères classiques. Je présenterai les caractéristiques de l'activité spontanée de certaines structures du système nerveux immature et mature, puis j'aborderai dans ces structures les questions d'initiation et de maintenance de l'activité spontanée et sa relation avec l'architecture fonctionnelle des réseaux sous-jacents.

2. Les motifs de l'activité spontanée

2.1. Vagues et oscillations lors du développement

L'activité spontanée des réseaux immatures peut apparaître avant la formation des connexions synaptiques grâce aux jonctions de type GAP (Yuste et al., 1995; Catsicas et al., 1998). Elles jouent un rôle important dans la propagation de l'activité électrique d'une cellule à l'autre. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'activité qui émane une fois que les synapses chimiques sont formées. L'activité semble alors dictée par la transmission synaptique même si elle peut, dans certains cas, être encore modulée par les jonctions de type

GAP (Wong et al., 1998). L'activité spontanée apparaît de façon similaire dans de nombreuses structures du système nerveux sous forme d'une activité rythmique oscillante. A l'échelle des neurones individuels, on observe la présence de bouffées de potentiels d'action séparées par de grands silences.

2.1.1. Dans la rétine

Dans la rétine d'embryons de plusieurs espèces, des bouffées de potentiels d'action sont générées dans les cellules ganglionnaires (Feller, 1999). Ces bouffées se propagent d'une cellule à l'autre dans toute la rétine sous forme de vagues périodiques très similaires d'une espèce à l'autre (Wong et al., 1998).

L'activité collective dans la rétine repose toujours sur la transmission synaptique excitatrice, néanmoins la nature de cette transmission diffère selon les espèces et avec l'âge. Chez le poulet, l'activité spontanée est supprimée au stade embryonnaire E8–E11 par des antagonistes de la transmission cholinergique (Catsicas et al., 1998) ; plus tard au stade E13–E18, elle n'est plus sensible aux antagonistes cholinergiques mais est supprimée par des antagonistes de la transmission glutamatergique et glycinergique, et renforcée par des antagonistes de la transmission GABAergique (Wong et al., 1998).

Tandis que dans la rétine de furet, lors du début du développement post natal (<P10), l'apparition de ces vagues nécessite la transmission cholinergique des cellules amacrines (Feller et al., 1996b; Penn et al., 1998), chez des furets plus âgés (>P18), c'est la transmission glutamatergique provenant des cellules bipolaires qui devient nécessaire (Wong, 1999).

Ainsi une activité rythmique est générée de façon très similaire chez différentes espèces. Dans tous les cas, la transmission synaptique est nécessaire à l'expression, au moins à grande échelle, de l'activité spontanée. En revanche, les types de transmission synaptique concernés diffèrent d'un exemple à l'autre. Au sein d'un même animal, l'activité se maintient sous forme de vagues collectives alors que les cellules initiatrices, caractérisées toujours par une transmission synaptique spécifique, ne restent pas les mêmes avec l'âge.

2.1.2. Dans la moelle épinière

Dans la moelle épinière isolée *in vitro*, on observe des bouffées de durée 5 à 90s qui reviennent toutes les 2 à 30 minutes. L'imagerie calcique de la moelle montre que ces épisodes sont associés après E10 à des augmentations de la concentration intracellulaire en calcium qui se propagent de façon orientée (dorsomédiale) à travers des milliers de neurones. Ces bouffées émises par des motoneurones sont dues à des dépolarisations rythmiques de

20mV à 40mV provoquées par les interneurones. L'excitation provient d'abord de la transmission cholinergique (Milner and Landmesser, 1999) puis glutamatergique (Chub and O'Donovan, 1998).

2.1.3. Dans l'hippocampe

Les événements périodiques qui nécessitent l'activation des récepteurs ionotropiques du GABA de type A sont générés au niveau de cellules glutamatergiques et GABAergiques (Khazipov et al., 1997). Leur présence est observée aussi dans la préparation entière du complexe septo-hippocampal et des bouffées similaires ont été mesurées *in vivo* (Leinekugel et al., 2002). Dans les tranches, les événements périodiques GDPs ou ENOs sont enregistrés dès les premiers jours après la naissance dans les régions CA1 de l'hippocampe et montrent une évolution spécifique en fonction des régions de l'hippocampe (Garaschuk et al., 1998) lors du développement. Les ENOs dans CA1 consistent en de multiples bouffées de potentiels d'action avec des intervalles de temps entre potentiels d'action de l'ordre de quelques secondes. Ils sont associés (Fig. 1) à des variations de la concentration de calcium intracellulaire synchrones dans toutes les cellules pyramidales et les interneurones de CA1 (Garaschuk et al., 1998), ce qui les distingue donc des vagues de propagation de la rétine ou de la moelle épinière. Ces transitoires calciques sont concomitants avec des entrées synaptiques massives (voir Fig. 1) indiquant que les ENOs sont dues à la transmission synaptique comme dans les réseaux spinaux ou rétiniens. Bien que l'excitation résulte d'une combinaison de l'action des neurotransmetteurs GABA et glutamate qui dépolarisent CA1, les antagonistes GABA A bloquent complètement tous les transitoires calciques. Cela suggère que le GABA soit la source primordiale d'excitation qui mène les oscillations de type ENOs, à l'inverse de la rétine ou de la moelle épinière où il joue un rôle modulateur.

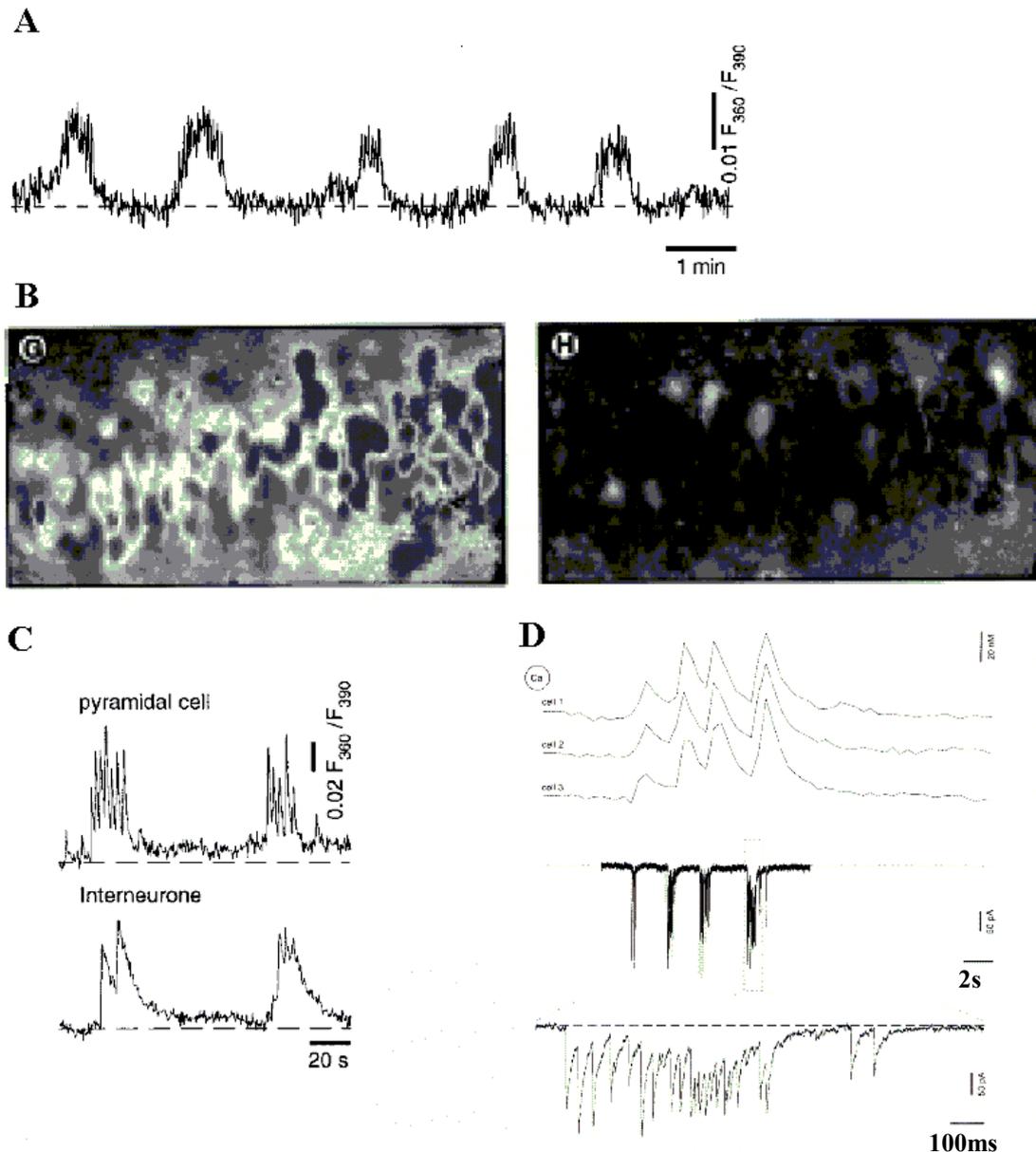


Figure 1. Les oscillations précoces des cellules de l'hippocampe *in vitro* au stade P1 observées après marquage des cellules avec le Fura 2 AM (d'après Garaschuk et al., 1998). **A.** Augmentations périodiques de la concentration en calcium intracellulaire dans un neurone de la région CA1 de l'hippocampe (stade post natal P1). **B.** Variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées dans une zone de 200 μ m dans CA1 pendant une bouffée spontanée : à gauche, une image de fluorescence de l'hippocampe pendant une oscillation collective, à droite pendant une période de silence. **C.** Les variations du calcium intracellulaire concernent les cellules pyramidales (trace du haut) comme les interneurones (trace du bas). **D.** Pendant une bouffée, les transitoires calciques représentés en haut de la figure sont associés à des entrées synaptiques massives représentées au milieu et agrandies en bas de la figure.

Conclusion

Dans les réseaux immatures, les motifs de l'activité spontanée se présentent sous forme de bouffées périodiques séparées par de longs silences, concerne des ensembles de cellules

qui déchargent de façon synchrone ou successivement via la propagation d'une vague d'excitation. Cette activité, observée, pour une même structure, de façon similaire dans différentes espèces, semble très robuste car elle peut se maintenir grâce à différents groupes de cellules, même lorsque la transmission synaptique est modifiée physiologiquement ou pharmacologiquement dans le réseau sous jacent.

2.2. Une activité plus diversifiée et complexe chez l'adulte

L'activité spontanée dans le cerveau adulte ne présente plus en général de motifs aussi prononcés que l'activité du type bouffées - silence que nous avons vu pour les réseaux immatures. L'activité spontanée du cortex ou de l'hippocampe montre une grande variété de fréquences et les neurones individuels ont des décharges irrégulières qui peuvent être assimilées à du bruit stochastique (Softky and Koch, 1993; Brunel et al., 2001). Néanmoins il semble que les réseaux corticaux génèrent spontanément pendant le sommeil des oscillations caractéristiques.

2.2.1. Dans le thalamus

Dans le thalamus *in vivo*, les cellules relais qui reçoivent l'information sensorielle oscillent pendant les phases de sommeil (Fig. 2) (Steriade et al., 1993). Leur activité n'est pas corrélée aux séquences de potentiels d'action provenant des voies sensorielles et empêche le transfert d'informations sensorielles vers le cortex. Une décharge oscillante similaire est observée en tranches (Fig. 2) (McCormick and Bal, 1994).

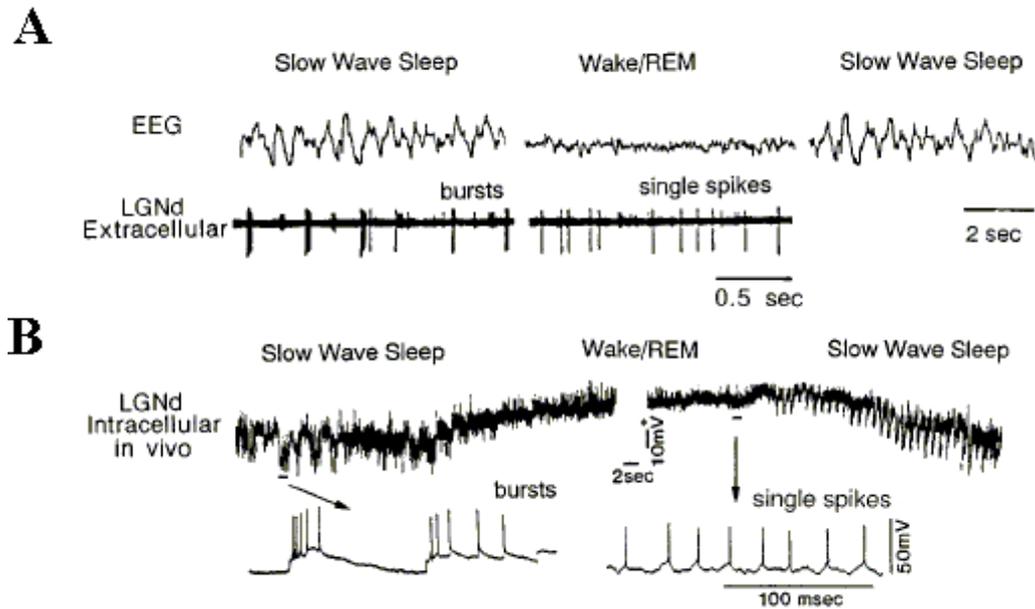


Figure 2. Electroencéphalogrammes (EEGs) et enregistrements intracellulaires de l'activité des neurones thalamo-corticaux du noyau géniculé latéral pendant les ondes lentes du sommeil chez le chat (McCormick and Bal, 1997). **A.** EEGs et enregistrements extracellulaires montrent la présence de bouffées de 3 à 5 potentiels d'action pendant les phases de sommeil (McCarley et al., 1983). **B.** Des enregistrements intracellulaires pendant les transitions éveil - sommeil montrent que le potentiel de membrane de la cellule se dépoliarise considérablement. Pendant les oscillations du signal d'EEG (correspondant aux ondes lentes du sommeil) des bouffées de potentiels d'action sont générées sur des dépoliarisations étalées et lentes. Pendant l'éveil, dépoliarisations et bouffées de potentiels d'action lents disparaissent et sont remplacées par des successions de potentiels d'action isolés (Hirsch et al., 1983).

2.2.2. Les états "UP" et "DOWN" du cortex

Pendant le sommeil ou lorsque l'animal est anesthésié, le cortex génère de l'activité récurrente sous forme d'oscillations lentes (0.1-0.5Hz, voir Fig. 3). Les tranches de cortex *in vitro*, incubées dans un bain dont les concentrations ioniques (en particulier en calcium et potassium) miment le milieu extracellulaire physiologique, montrent une activité spontanée similaire (Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Cette activité semble provenir de la couche 5 du cortex et se propager à travers ses autres couches. Le cortex génère intrinsèquement un niveau d'activité haut (état « UP ») entrecoupé de périodes de faible activité (état « DOWN »). Les transitions spontanées entre l'état d'activation auto-entretenu et l'état basal pourraient être à l'origine des rythmes du sommeil.

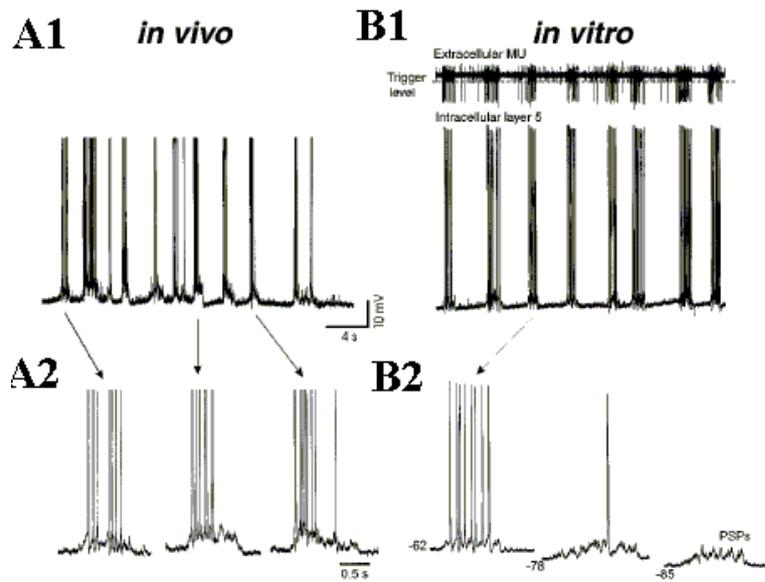


Figure 3. Oscillations lentes dans le cortex (d'après Sanchez-Vives and McCormick, 2000). A1. Des enregistrements intracellulaires *in vivo* dans le cortex visuel primaire d'un chat anesthésié révèle une séquence rythmique de potentiels dépolarisés et hyperpolarisés avec une périodicité de 3s environ. A2. Grossissement de 3 dépolarisations. B1. Des enregistrements simultanés intracellulaires (neurones de la couche 5) et extracellulaires montrent les oscillations lentes observées dans les tranches de cortex visuel chez le furet qui sont maintenues dans un milieu à bas calcium *in vitro*. Leur périodicité est de 4s environ. On note la grande synchronisation des deux enregistrements. B2. Grossissement de l'état dépolarisé à trois potentiels de membrane différents.

2.2.3. Décharges complexes des cellules pyramidales et interneurons de l'hippocampe

Les cellules pyramidales de l'hippocampe montrent de l'activité spontanée avec des motifs divers et complexes (Fig. 4A). Elles peuvent montrer des potentiels d'action isolés et des bouffées de quelques potentiels d'action avec des intervalles de temps courts (Ranck, 1973; Harris et al., 2002a). Les interneurons de l'hippocampe génèrent aussi spontanément une grande variété de profils de décharge (Fig. 4B): décharge régulière, irrégulière ou sous forme de bouffées de potentiels d'action (Parra et al., 1998).

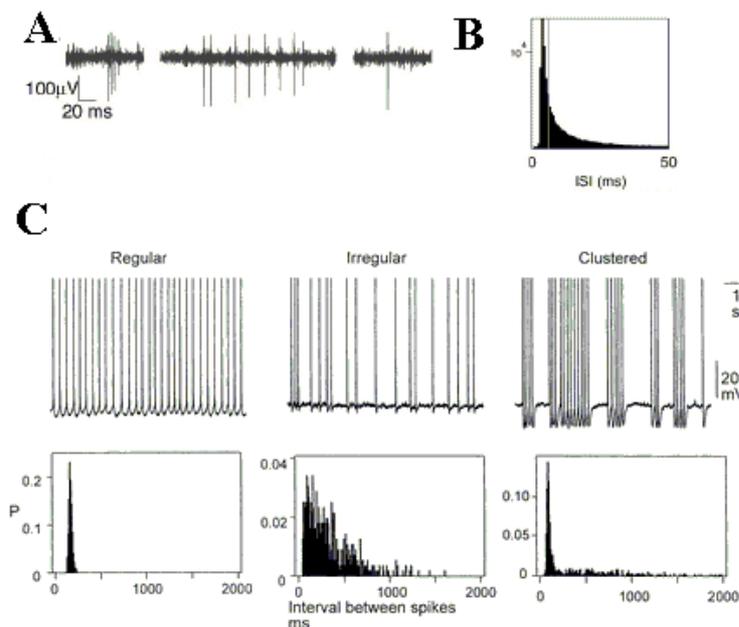


Figure 4. Activité spontanée de cellules pyramidales et d'interneurons dans l'hippocampe. A. Exemples de bouffées de cellules pyramidales *in vivo* (Harris et al., 2002a). B. L'histogramme correspondant des intervalles de temps entre potentiels d'action (Inter Spike Intervals, ISIs) de plusieurs cellules pyramidales. C. Exemples de décharge spontanée ou obtenue en injectant un faible courant dans des interneurons de l'hippocampe *in vitro* (Parra et al., 1998). L'histogramme correspondant aux ISIs est représenté en dessous pour chaque interneurone.

Conclusion

L'activité spontanée est très différente dans les réseaux immatures et matures. Sous forme de bouffées collectives séparées par de longs silences dans les réseaux immatures, elle évolue chez l'adulte vers une dynamique moins synchronisée, plus riche et complexe. L'activité spontanée montre, lors du sommeil ou chez l'animal anesthésié, différents niveaux d'activation du réseau. Nous allons présenter désormais certains mécanismes proposés pour rendre compte de la dynamique de l'activité spontanée (initiation et maintenance) et dégager les différences majeures entre l'architecture fonctionnelle des réseaux matures et immatures.

3. Contrôle de la dynamique de l'activité spontanée

3. 1. Réseaux immatures

3.1.1. Un contrôle par l'excitation récurrente

L'activité spontanée décrite précédemment dans les réseaux immatures repose sur l'intégrité des synapses chimiques : aucun circuit défini ne garde une décharge autonome lorsque les synapses qui entretiennent l'activité viennent d'être bloquées. L'activité collective est fondée sur les connexions excitatrices récurrentes (voir Fig. 5A2) qui permettent à l'excitation de réverbérer en boucle dans le réseau. Nous allons voir que ces connexions excitatrices récurrentes sont liées à différentes neurotransmissions : soit cholinergique (Feller et al., 1996b; Catsicas et al., 1998), soit glutamatergique (Chub and O'Donovan, 1998; Wong et al., 1998) soit GABAergique (Garaschuk et al., 1998).

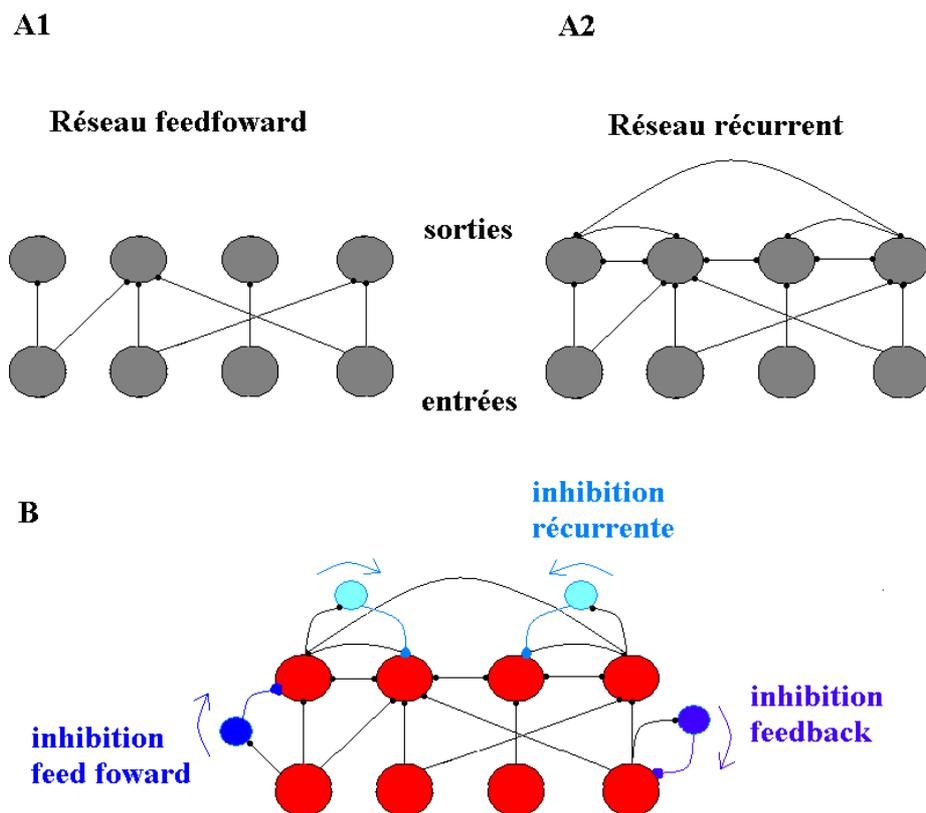


Figure 5. Réseaux excitateurs et circuits d'inhibition disynaptique. **A.** Réseau excitateur. **A1.** Réseau excitateur feedforward avec des entrées, des sorties et des connexions polarisées. **A2.** Réseau excitateur récurrent avec des entrées, des sorties et des connexions récurrentes. Bien que nous ayons dessiné les connexions entre les neurones de sortie bidirectionnelles, cela n'implique pas que les efficacités synaptiques soient de poids égal dans les deux directions. **B.** Les circuits d'inhibition disynaptique sont représentés dans un réseau récurrent excitateur. Les cellules excitatrices et inhibitrices sont rouges et bleues respectivement. L'inhibition feedforward implique l'activation d'un interneurone (bleu foncé) par un neurone excitateur d'entrée qui va ensuite inhiber un neurone excitateur de sortie. L'inhibition récurrente implique l'activation d'un interneurone (bleu clair) par un neurone excitateur de la même couche (couche de sortie dans notre exemple) qui va ensuite inhiber un neurone excitateur de la même couche. L'inhibition « feedback » implique l'activation d'un interneurone (violet) par un neurone excitateur d'entrée qui va inhiber en retour un neurone excitateur d'entrée.

Dans la rétine de poulet, l'initiation et le maintien de l'activité spontanée lors d'une vague reposent sur la transmission synaptique excitatrice (respectivement cholinergique et glutamatergique), et sa propagation nécessite le couplage entre cellules ganglionnaires par des jonctions de type GAP (Wong et al., 1998). Chez le furet, dans les premiers stades postnataux, les entrées cholinergiques provenant des cellules amacrines qui permettent la dépolarisation des cellules ganglionnaires pendant les vagues sont aussi nécessaires à leur initiation (Feller, 2002). En revanche, l'origine des entrées que reçoivent les cellules amacrines pendant les vagues ne sont pas connues.

Dans la moelle épinière, les motoneurones ne semblent pas impliqués dans la genèse des bouffées puisque le blocage pharmacologique de leurs collatérales n'altère pas l'activité de réseaux. Puisque aucun neurone générateur de rythme ou oscillateur n'a été observé en

bloquant la transmission synaptique, l'initiation de l'activité semble provenir des propriétés de réseau (O'Donovan et al., 1998). De façon surprenante, la génération d'activité spontanée ne repose pas finement sur l'architecture du réseau sous jacent : ni de ses connexions spécifiques, ni de leur nature. En effet, l'activité peut être initiée dans des portions isolées de la moelle épinière et générée autant par des réseaux glutamatergiques / cholinergiques ou GABAergiques / glycinergiques (Chub and O'Donovan, 1998). L'initiation de l'activité pourrait être consécutive à un état de haute excitabilité du réseau qui dépend de sa connectivité récurrente, de la nature dépolarisante des neurotransmetteurs de la moelle épinière précoce, de la présence d'une innervation en excès et de l'expression transitoire de récepteurs au glutamate et des canaux calciques dépendant du potentiel activés à bas seuils de type T.

Dans l'hippocampe immature, l'initiation des oscillations ENOs nécessite l'activation des synapses GABAergiques, excitatrices à ce stade précoce. Lors des oscillations, des événements synaptiques ayant principalement une origine GABAergique mais aussi glutamatergique assurent le maintien de l'activité (Leinekugel et al., 1997; Garaschuk et al., 1998). En outre, au cours du développement de P1 à P16, l'amplitude des ENOs diminue de façon concomitante avec la transformation de l'origine de la transmission excitatrice : du GABA au glutamate. Les GDPs pourraient émerger lorsqu'une augmentation de l'activité synaptique et cellulaire dépasse un seuil donné de fréquence (Menendez de la Prida et al., 1998). L'activité spontanée de fond semble se synchroniser en quelques centaines de millisecondes avant l'initiation des GDPs. Des enregistrements simultanés de cellules pyramidales et d'interneurones suggèrent que les GDPs ne soient pas initiés par un seul groupe de cellules génératrices mais par la coopération récurrente de plusieurs groupes caractérisés par une décharge à des fréquences propres et provenant de régions différentes (Menendez de la Prida and Sanchez-Andres, 2000).

3.1.2. Arrêt et périodicité sous contrôle de la dépression du réseau

Dans la moelle épinière, l'activité est déprimée après une bouffée si bien que le réseau est réfractaire à une stimulation (Chub and O'Donovan, 1998; O'Donovan et al., 1998). Plusieurs observations tendent à montrer que l'excitabilité du réseau est déprimée de façon transitoire après une bouffée puis revient doucement à sa valeur normale : i) les réponses à des applications de GABA et de glutamate sont diminuées après une bouffée et ré-augmentent progressivement, ii) on peut observer une hyperpolarisation dépendante du GABA à la fin d'une bouffée et iii) les amplitudes des potentiels synaptiques évoqués et spontanés sont

réduites après un épisode et reviennent en plusieurs secondes à leurs valeurs basales. Lorsque l'excitabilité est retrouvée, des neurones recommencent à émettre des potentiels d'action et quand ils forment une fraction suffisante, une bouffée est ré-initiée (Fedirchuk et al., 1999). Ces mécanismes de dépression sous contrôle de l'activité semblent suffisants pour rendre compte de l'aspect périodique de cette activité rythmique dans un réseau excitateur récurrent (Tabak et al., 2000; Tabak et al., 2001). Les mécanismes à l'origine de la récupération de l'excitabilité ne sont pas bien cernés ; ils pourraient correspondre au remplissage du pool de réserve de vésicules à la synapse ou à l'augmentation de la libération présynaptique ou encore à une augmentation de l'excitabilité postsynaptique.

3.1.3. Homéostasie dans les circuits immatures

Malgré la diversité d'architecture des réseaux de neurones entre espèces et des transformations avec l'âge de la nature de la transmission synaptique excitatrice (principalement glutamatergique, cholinergique ou GABAergique) à l'origine de l'initiation des bouffées collectives, une activité périodique collective spontanée apparaît de façon reproductible avec des caractéristiques très conservées.

Dans la moelle épinière, l'expression de l'activité collective et périodique est robuste à tel point que le blocage de l'excitation cholinergique et glutamatergique qui soutient l'activité n'a qu'un effet transitoire : au bout d'une heure environ l'activité reprend avec les mêmes caractéristiques (Chub and O'Donovan, 1998). Elle est alors conduite par l'activité des réseaux GABAergiques. Cela suggère que des mécanismes de régulation dépendant de l'activité et agissant sur les efficacités synaptiques (Turrigiano et al., 1998) ou sur l'excitabilité des cellules (Turrigiano et al., 1994) soient mis en jeu pour assurer la robustesse de cette activité périodique.

Conclusion

Dans les réseaux immatures, l'initiation et le maintien de l'activité spontanée sous forme de bouffées collectives semblent dominés par des mécanismes d'excitation récurrente qui permettent d'entretenir l'excitation réverbérante dans le réseau (voir Fig. 5A2). Un réseau excitateur récurrent impliquant des neurotransmetteurs excitateurs variables soutient une activité périodique, collective et robuste. Pour arrêter les bouffées de potentiels d'action, l'excitation récurrente doit être contrebalancée par des mécanismes de rétrocontrôle négatifs. Dans la moelle épinière, la dépression de l'excitabilité du réseau déterminerait la fin des bouffées collectives et générerait, par un mécanisme lent de récupération, leur périodicité.

3.2. Dans les réseaux matures

Dans les réseaux matures, l'activité spontanée n'est plus uniquement dominée par l'excitation réverbérante qui conduit à des bouffées collectives. La présence de circuits locaux d'inhibition et les propriétés intrinsèques des neurones jouent désormais des rôles importants dans le contrôle du niveau d'activité et l'élaboration de motifs complexes dans la dynamique de l'activité spontanée.

3.2.1. Cellules à la décharge autonome

Dans des tranches d'hippocampe, des cellules montrent une décharge autonome même lorsque les synapses excitatrices et inhibitrices sont bloquées (Cohen and Miles, 2000). Lorsque la transmission synaptique est bloquée, les propriétés intrinsèques des cellules suffisent à initier dans plusieurs structures de l'activité spontanée (Bevan and Wilson, 1999; Cohen and Miles, 2000). L'activation d'une cellule ou d'un groupe de quelques cellules pourrait entraîner l'activité dans le reste du réseau (Miles and Wong, 1983). L'activité spontanée initiée par ces cellules à la décharge autonome ou bien émanant de l'excitation du réseau pourrait se maintenir dans le réseau grâce à l'excitation synaptique réverbérante (Wang, 2001). Il est très difficile expérimentalement (*in vivo* comme en tranche) de séparer les rôles des propriétés des synapses des propriétés du réseau telles que les boucles d'activation successive qui participent à cette excitation réverbérante.

Plusieurs travaux suggèrent que certaines cellules pyramidales peuvent avoir une décharge autonome et peut être générée une activité spontanée du réseau. En même temps, l'excitation par les cellules pyramidales des interneurons locaux (Gulyas et al., 1993; Buhl et al., 1994; Markram et al., 1997) pourrait en agissant localement réduire le niveau d'activité globale d'une structure (Cohen and Miles, 2000). L'inhibition locale pourrait ainsi exercer ce contrôle déterminant sur le niveau d'activité et empêcher une augmentation galopante de l'excitation réverbérante. La balance inhibition / excitation pourrait assurer la stabilité de l'activité corticale. Elle pourrait permettre à l'échelle du neurone une décharge stochastique avec une grande diversité de fréquences de décharge, et à l'échelle du réseau, un niveau maintenu de l'activité spontanée et persistante pendant plusieurs secondes.

3.2.2. Des circuits locaux d'inhibition

La connectivité récurrente entre cellules pyramidales (voir Fig. 5A2) existe à l'intérieur d'une couche du cortex comme entre différentes couches corticales (Abeles 1991).

Cet arrangement permet l'existence d'un réseau excitateur interconnecté à la fois horizontalement et verticalement.

Une grande variété de neurones inhibiteurs GABAergiques sont interposés dans ce réseau excitateur récurrent. Les axones des cellules pyramidales innervent localement d'autres cellules pyramidales (connexions récurrentes, voir Fig. 5A2) mais aussi les interneurons GABAergiques qui peuvent en retour innerver les cellules pyramidales de la même couche (inhibition récurrente, voir Fig. 5B) ou d'une autre couche (inhibition « feedback » ou « feedforward », voir Fig. 5B). Dans l'hippocampe, l'existence de nombreux circuits locaux d'inhibition disynaptique révélée par l'anatomie a été confirmée par des enregistrements de paires de cellules : des circuits d'inhibition de type « feedforward » (Alger and Nicoll, 1982; Freund and Buzsaki, 1996) ou récurrents (Knowles and Schwartzkroin, 1981; Miles et al., 1984; Miles and Wong, 1986; Lacaille et al., 1987; Miles, 1990; Ali et al., 1999).

La diversité des neurones GABAergiques (Freund and Buzsaki, 1996) et des propriétés de leurs synapses (Gupta et al., 2000) suggère qu'ils puissent constituer des éléments clé à l'origine de la complexité des dynamiques de l'activité spontanée observée chez l'adulte.

En outre, ces motifs de connectivité spécifiques entre neurones inhibiteurs et excitateurs placent les neurones GABAergiques dans une position centrale de régulation des communications excitatrices au sein du cortex, du thalamus ou de l'hippocampe. Une réduction ou une perte de cette régulation entraîne la génération de décharges synchrones et puissantes caractéristiques de l'épilepsie (Dichter and Spencer, 1969; Wong et al., 1986; McKinney et al., 1997; McCormick and Contreras, 2001). Cela suggère qu'il existe dans les conditions physiologiques une régulation de la balance entre excitation et inhibition, bien que la nature précise de ces mécanismes de régulation ne soit pas bien connue.

3.2.3. Une régulation de la balance excitation / inhibition de l'activité corticale

Pendant les vagues lentes du sommeil et de façon similaire dans des tranches du cortex *in vitro*, les réseaux récurrents locaux peuvent générer des périodes d'activité persistant pendant 1 à 4 secondes (état « UP ») séparée par des périodes de silence (état « DOWN », (Sanchez-Vives and McCormick, 2000)). Un équilibre finement régulé entre excitation et inhibition locale est essentiel pour l'existence d'états d'activités auto-entretenus (Shu et al., 2003). En outre, l'ensemble des événements synaptiques excitateurs et inhibiteurs dépolarisent les cellules et augmentent au niveau du potentiel de membrane le bruit associé à

l'activité dans l'état « UP ». Ce bruit permet de rendre les neurones corticaux plus sensibles à de petites entrées (voir Fig. 6).

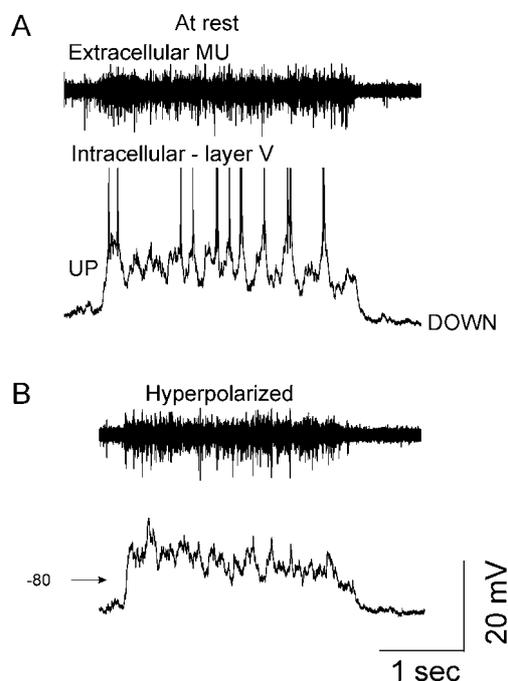


Figure 6. Le cortex préfrontal du furet génère *in vitro* spontanément des périodes d'activité longues caractérisées par des arrivées massives d'évènements synaptiques (d'après Shu et al., 2003).

A-B. Enregistrements simultanés extracellulaire (haut) et intracellulaire (bas) dans la couche 5 du cortex préfrontal. **A.** La cellule enregistrée en intracellulaire est au potentiel de repos pendant la transition vers l'état « UP » du réseau. Le réseau entre dans l'état « UP » pour environ 3s avant une transition rapide vers l'état « DOWN ». **B.** L'hyperpolarisation de la cellule pyramidale enregistrée en intracellulaire (bas) révèle des arrivées massives de potentiels postsynaptiques pendant l'état « UP » et leur réduction pendant l'état « DOWN ». On note que l'hyperpolarisation comme la dépolarisation n'affectent pas la durée des états « UP » qui reste identique à la durée de la décharge de potentiels d'action du réseau local.

3.2.4. Interaction entre les propriétés intrinsèques des cellules et les circuits locaux d'excitation / inhibition

Considérons l'exemple du circuit d'inhibition de rétrocontrôle dans le thalamus qui permet de contrôler la transmission des entrées sensorielles vers le cortex en fonction de l'état d'éveil d'un individu. Une activité rythmique peut être générée à partir de circuits locaux constitués par des neurones excitateurs et inhibiteurs avec des interactions réciproques (circuit d'inhibition « feedback », voir Fig. 5B). L'activité oscillante des cellules relais thalamo-corticales pendant le sommeil est permise par l'architecture fonctionnelle du réseau et leurs propriétés intrinsèques (McCormick and Bal, 1994). Les cellules relais sont plus hyperpolarisées pendant les états de sommeil que de vigilance. Ces oscillations sont dues à des connexions réciproques entre les cellules relais et les interneurons inhibiteurs de la formation réticulée du thalamus. Les cellules relais excitent par leurs collatérales les interneurons inhibiteurs qui en retour les inhibent. Le potentiel post synaptique inhibiteur qui en résulte désactive dans les cellules relais les canaux calciques de type T dépendant du potentiel et activés à bas seuil. Grâce à cette désinactivation, les cellules relais déclenchent

pendant la repolarisation un potentiel d'action calcique surmonté de potentiels d'action sodiques. Elles activent à nouveau les interneurons réticulés et auto-entretiennent le couplage excitation / inhibition (Huguenard and McCormick, 1992).

Lorsque le gain dans la boucle de rétro-contrôle inhibitrice dépasse une valeur critique, le circuit oscille et les entrées rétinienne ne sont pas corrélées temporellement à la sortie thalamique. Le cortex est alors déconnecté des entrées sensorielles comme dans les états de sommeil. En revanche, si le gain est faible dans la boucle d'inhibition de rétro-contrôle et que l'excitabilité de la cellule est modulée par la noradrénaline pendant l'état d'éveil, la corrélation entrée-sortie augmente dans les cellules relais et les informations sensorielles sont transmises au cortex (Le Masson et al., 2002).

Cet exemple illustre comment l'architecture fonctionnelle du réseau, fondée entre autre sur un circuit d'inhibition de rétro-contrôle local autorise deux dynamiques de l'activité des cellules relais : oscillations intrinsèques ou transfert. La modulation des propriétés intrinsèques des cellules relais, qui déterminent l'excitabilité, va permettre la transition entre les deux états d'activation du réseau. On voit dans cet exemple qu'architecture fonctionnelle du réseau et propriétés intrinsèques des cellules agissent de paire pour déterminer la dynamique de l'activité spontanée et contrôler le transfert de l'information entre structures dans le cerveau.

Conclusion

J'ai passé en revue brièvement différents exemples de contrôle de l'activité spontanée dans des réseaux matures et immatures du système nerveux des vertébrés. De façon un peu schématique, l'activité spontanée des réseaux immatures s'oppose à celles des réseaux matures par *i*) l'apparente monotonie des rythmes générés (bouffées collectives et synchrones intercalées de longs silences) et *ii*) la robustesse de cette activité périodique qui semble ne pas être trop dépendante de la connectivité précise du réseau. Les réseaux matures montrent au contraire une grande richesse de dynamiques générées spontanément. Et les motifs de cette activité spontanée sont très sensibles à des modifications de la balance excitation / inhibition comme à la modulation de l'excitabilité des cellules par des neuromodulateurs.

Par ailleurs, une différence majeure qui distingue réseaux matures et immatures réside dans l'architecture fonctionnelle (connectivité et nature des neurones) des réseaux qui la sous tendent. Les réseaux qui génèrent l'activité spontanée lors des phases précoces du développement sont des réseaux récurrents dominés par l'excitation (principalement d'origine glutamatergique, GABAergique ou cholinergique). En revanche, les réseaux matures dans le

cerveau montrent une architecture complexe comprenant entre autres des circuits d'inhibition disynaptiques variés qui pourraient former des unités de contrôle locales nécessaires pour stabiliser le niveau d'activité et permettre sa diversité. Les propriétés intrinsèques des cellules et les circuits locaux d'inhibition disynaptiques semblent agir conjointement pour définir la dynamique de l'activité spontanée et le transfert de l'information d'une structure à une autre. Ensemble ils contribuent à l'initiation et au maintien de l'activité spontanée et persistante.

4. De l'approche en culture

4.1. Objectifs

Comme je l'ai évoqué, mon objectif a consisté à préciser les questions suivantes : *i)* dans un réseau de neurones excitateurs, quels sont les mécanismes synaptiques et les propriétés de réseau qui rentrent en jeu pour initier l'activité et permettre sa maintenance ? *ii)* quelles relations existent entre les motifs possibles de l'activité spontanée et l'architecture fonctionnelle du réseau (nombre de neurones, connectivité et présence de neurones inhibiteurs) qui les génère ?

4.2. Les limitations expérimentales des préparations classiques

Un avantage majeur pour étudier l'activité spontanée des préparations utilisées classiquement (*in vivo*, préparations isolées *in vitro* ou bien les tranches) réside dans le fait que le développement des neurones a eu lieu dans des conditions physiologiques. Les propriétés membranaires intrinsèques et l'architecture des connexions synaptiques entre neurones sont assez bien conservées. Or nous avons vu que ces derniers paramètres, en particulier chez l'adulte, sont critiques pour façonner les motifs de l'activité spontanée.

Néanmoins dans ces systèmes, il est impossible de connaître l'architecture fonctionnelle du réseau de neurones (nature des neurones et leur connectivité) que l'on étudie et de suivre l'activité sur un ensemble de neurones (>2) connectés. En effet, la structure complexe des systèmes physiologiques amène certaines limitations expérimentales :

- 1) Il est impossible d'enregistrer simultanément par des techniques électrophysiologiques ou optiques l'activité de tous les neurones qui forment un réseau.
- 2) Lorsqu'on suit l'activité de plus de deux neurones en extracellulaire, la connectivité précise entre neurones n'est pas connue mais estimée à partir du timing des potentiels d'action de chacun.

- 3) La distinction entre les propriétés synaptiques et les propriétés de réseaux qui contribuent à l'excitation réverbérante supposée être à la base de la maintenance de l'activité (Wang, 2001) est difficile à réaliser. En conséquence de 1) et 2), les effets de propagation de l'excitation dans des boucles récurrentes sont difficiles à mettre en évidence.
- 4) Le rôle du bruit synaptique dans l'initiation de l'activité spontanée est difficile à évaluer. On a vu que certaines cellules montrent une décharge autonome qui pourrait initier de l'activité spontanée chez l'adulte (Cohen and Miles, 2000). Néanmoins, la contribution relative dans l'activation globale du réseau de l'activité de cellules à la décharge autonome et du bruit synaptique est difficile à estimer.

Ces raisons nous ont motivés à développer un système de cultures de neurones dans lequel l'architecture des réseaux neuronaux serait contrôlée. Je vais d'abord présenter les caractéristiques des neurones en culture, les avantages et inconvénients de cette approche, et enfin mon étude.

4.3. Les caractéristiques des neurones en culture en conditions définies

La culture de neurones primaires constitue un modèle hybride entre les neurones en développement (stade embryonnaire) et les neurones matures. Les neurones peuvent être isolés à partir de structures, telles que l'hippocampe ou le cortex, prélevées sur des embryons. Ils sont dissociés chimiquement et mécaniquement pour êtreensemencés dans des boîtes de pétri (Fig. 7) où un milieu défini leur permet d'être maintenus pendant plusieurs semaines *in vitro* (Banker and Goslin, 1988). Maintenus à basse densité en culture (Banker and Goslin, 1988; Goslin and Banker, 1989), les neurones sont dans des conditions très spécifiques : dans un milieu extracellulaire défini privé de sérum avec moins de 5% de cellules gliales sur la lamelle de verre. Les neurones maintiennent néanmoins leur structure polarisée (Bartlett and Banker, 1984; Dotti et al., 1988; Goslin and Banker, 1989; Morgenthaler et al., 2003), une morphologie caractéristique avec des épines (Papa et al., 1995) et conservent leur excitabilité (Siebler et al., 1993; Evans et al., 1998).



Figure 7. Image de microscopie électrique à balayage d'une cellule pyramidale de l'hippocampe qui s'est développée sur une lamelle de verre (Verderio et al., 1999).

On trouve tous les types cellulaires présents dans la structure en culture. Dans le cas des cultures d'hippocampe, les neurones glutamatergiques ont la morphologie caractéristique des cellules pyramidales. Les interneurons GABAergiques montrent une grande diversité (Kapur et al., 2002). Neurones GABAergiques et glutamatergiques sont dans des proportions proches de ce qui est observé dans l'hippocampe (entre 5-15% environ) (Baranes et al., 1996; Craig et al., 1996; Grosse et al., 1998). Les synapses GABAergiques et glutamatergiques qu'ils forment exhibent les protéines caractéristiques des domaines pré- et post- synaptiques caractéristiques (Craig et al., 1993; Grantyn et al., 1995; Craig et al., 1996; Verderio et al., 1999) et sont fonctionnelles (Wilcox et al., 1994). Les synapses des neurones en culture conservent une composition et une morphologie caractéristiques ce qui suggère que leur développement suit un programme intrinsèque (Grosse et al., 1998). Elles montrent de la plasticité à long terme de type LTD (Goda and Stevens, 1996) et LTP (Bi and Poo, 1998). Le GABA est dépolarisant pendant la première semaine de culture puis devient hyperpolarisant au début de la deuxième semaine de culture (Voigt et al., 2001; Opitz et al., 2002).

Ainsi à plusieurs égards les neurones en culture prélevés au stade embryonnaire semblent développer des caractéristiques de neurones « matures » *in vitro*. Beaucoup de groupes utilisent les systèmes de culture avec l'idée que les mécanismes fondamentaux concernant le développement (Xiang et al., 2002), la transmission synaptique (Jo and

Schlichter, 1999), la régulation homéostatique des synapses par l'activité (Turrigiano et al., 1994; Turrigiano et al., 1998), la plasticité (Bi and Poo, 1999; Tao et al., 2000) ou bien encore les interactions entre neurones et cellules gliales (Nagler et al., 2001), sont proches en culture des conditions physiologiques.

4.4. Intérêts et limites de l'approche en culture

4.4.1 Intérêts

Un grand avantage réside dans le fait que les neurones montrent une grande synaptogénèse (Verderio et al., 1999). Lors de leur maturation *in vitro* l'évolution de la polarité (Bartlett and Banker, 1984; Dotti et al., 1988), de leurs propriétés synaptiques (telles que l'expression de récepteurs (Pickard et al., 2000)), ou de la nature de l'inhibition GABAergique (Voigt et al., 2001) rappelle à certains égards le développement observé dans l'animal entier.

Si tous les résultats mis en évidence en culture demandent à être confirmés dans des systèmes où le développement suit son cours normal, il n'empêche que la culture apporte plusieurs avantages au niveau expérimental :

- 1) la possibilité de contrôle du milieu extracellulaire et d'application d'agents pharmacologiques (Voigt et al., 2001; Harris et al., 2002b; Opitz et al., 2002) ;
- 2) le suivi des cellules au cours de la maturation *in vitro* ;
- 3) la possibilité de suivre les effets de traitements chroniques (Turrigiano et al., 1998) ;
- 4) l'enregistrement de neurones multiples au sein de microcultures isolées (Fitzsimonds et al., 1997) ;
- 5) la possibilité d'enregistrer et de stimuler des cellules avec le système de multiélectrodes MEAs (MultiElectrodesArrays, (Hammerle et al., 1994; Egert et al., 2002b)).

4.4.2. Limites

Les inconvénients de l'approche en culture résident dans le fait que 1) la morphologie des cellules ne permet pas une reconnaissance systématique des types de cellules ; 2) les interactions et la position des neurones évoluent avec le temps *in vitro* : aucun ordre ne se met en place ; 3) les probabilités de contacts monosynaptiques entre neurones proches sont faibles en culture standard (Sylvain Hugel, communication personnelle) ; 4) l'expression de certaines

propriétés des neurones (telles que la densité de synapses ou la croissance des neurites) dépend beaucoup de la densité des neurones en culture (van den Pol et al., 1998). En outre, les cellules se développent sans interaction proche avec les cellules gliales ni avec autant de neurones cibles que dans l'animal entier, ce qui peut grandement modifier leurs caractéristiques (Rao et al., 2000; Nagler et al., 2001).

4.4.3. Dans le but de suivre l'activité spontanée de réseaux de neurones

Dans plusieurs systèmes, il a été montré que les motifs généraux de l'activité spontanée qui caractérisent une structure sont conservés en culture (dans le cas de la rétine (Harris et al., 2002b), ou de l'hippocampe (Voigt et al., 2001)). Dans le cas des cultures de neurones du cortex ou de l'hippocampe, l'activité spontanée montre des stades différents de maturation, comme la transition du GABA de dépolarisant vers hyperpolarisant (Voigt et al., 2001; Opitz et al., 2002). En effet, dans des cultures, au début de la deuxième semaine, il semble que les neurones GABAergiques du cortex génèrent d'une grande partie de l'excitation à l'origine d'une activité spontanée synchronisée (Voigt et al., 2001). Ces oscillations peuvent être supprimées par une application de bicuculline ou de CNQX indiquant que les neurones GABAergiques et glutamatergiques génèrent ensemble l'activité. A la fin de la deuxième semaine de culture, le GABA est inhibiteur (Opitz et al., 2002).

La culture peut permettre de faciliter le suivi expérimental de l'activité d'un réseau de neurones qui initient ou maintiennent l'activité spontanée. Néanmoins, l'approche de culture standard comporte des inconvénients majeurs pour étudier les liens entre l'activité spontanée et l'architecture fonctionnelle des réseaux qui la génèrent : la connectivité des réseaux de neurones en culture n'a plus rien de commun avec leur organisation *in situ*, et ne reste même pas stable puisque les neurones sont constamment en mouvement, surtout dans les premiers jours.

4.5. Des réseaux d'architecture contrôlée *in vitro*

Ces limitations de l'approche en culture nous ont amené à développer une méthode pour contrôler l'architecture de réseaux de neurones hippocampiques *in vitro*. J'ai utilisé la photolithographie pour sélectionner par des motifs d'adhésion la position de leur corps cellulaire sur une lamelle de verre et forcer le guidage de leurs neurites selon des axes définis. Construire des petits réseaux de neurones fermés dont l'architecture (le nombre de neurones et leur position) est contrôlée, permet d'espérer naïvement orienter leur connectivité.

La réalisation de réseaux d'architecture contrôlée permet de réaliser plusieurs structures de réseaux de neurones en fonction de leur taille : du réseau excitateur le plus simple et synchrone (l'autapse excitatrice), aux réseaux pluricellulaires excitateurs ou bien aux réseaux qui comprennent des neurones GABAergiques. En comparant l'activité d'un neurone isolé à celle de réseaux pluricellulaires, on peut distinguer les propriétés de réseau (réverbération de l'excitation) et les propriétés synaptiques qui peuvent contribuer à la maintenance de l'activité électrique.

Conclusion

La structure des réseaux de neurones qui se met en place lorsque la croissance des neurites est guidée n'a rien à voir avec la structure des réseaux de neurones *in vivo*, néanmoins l'architecture fonctionnelle du réseau (nombre de neurones, présence de neurones inhibiteurs) peut être caractérisée et reste fixe au cours du temps. Nous pouvons donc espérer établir un lien entre l'architecture fonctionnelle du réseau de neurones isolé qui s'est mise en place lors de la maturation *in vitro*, et les motifs de l'activité spontanée qu'il développe. Nous avons l'espoir que ces petits réseaux de neurones montrent de l'activité spontanée et que les mécanismes mis en jeu dans sa génération et sa maintenance reflètent des mécanismes opérant *in vivo*.

Plan de la thèse

Je présenterai en premier lieu la technique de lithographie et je caractériserai les propriétés des neurones dans les réseaux d'architecture contrôlée (Chapitre I). La *structure fonctionnelle* d'un réseau de neurones sera définie par le nombre de neurones, leur nature glutamatergique/GABAergique, la connectivité entre neurones.

Puis j'exposerai, dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, les méthodes qui m'ont permis de suivre l'activité spontanée : mesure de Patch Clamp en configuration cellule attachée et imagerie calcique de fluorescence avec le Fura 2 AM. Je présenterai alors le protocole d'immunocytochimie qui nous permet d'identifier la nature des neurones (glutamatergique / GABAergique) et ainsi de définir l'architecture fonctionnelle d'un réseau d'architecture contrôlée (Chapitre II).

Je présenterai ensuite l'étude des mécanismes synaptiques d'initiation et de maintenance de l'activité spontanée que j'ai menée sur les réseaux de neurones excitateurs (Chapitre III).

Dans le dernier chapitre, je présenterai le lien entre la structure fonctionnelle d'un réseau et la dynamique de l'activité spontanée caractérisée à partir de 3 paramètres : i) le profil de décharge des neurones individuels ; ii) les états activation du réseau ; iii) l'apparition d'assemblées de neurones synchrones. Nous mettrons en exergue en particulier les rôles des neurones inhibiteurs sur l'activité individuelle des neurones excitateurs qui les entourent et sur la dynamique collective de l'activité (Chapitre IV).

Je discuterai enfin des intérêts et limites de l'approche des réseaux d'architecture contrôlée en culture, des résultats et questions qu'ils soulèvent quant aux mécanismes d'initiation et de persistance de l'activité dans des réseaux de neurones excitateurs, et aux actions locales ou globales des neurones inhibiteurs.

I. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DES RESEAUX DE NEURONES BIOLOGIQUES

I.1. Principe

Depuis de nombreuses années, différents groupes ont cherché à développer des méthodes pour contrôler l'organisation de réseaux de neurones en culture. Dans ces études, l'objectif est d'imposer le nombre de neurones et de fixer la position de leurs corps cellulaires à des endroits pré-définis (de sorte qu'ils y restent fixes plusieurs semaines) et de guider la croissance des neurites en espérant orienter la façon dont les neurones se connectent entre eux.

Ces études trouvent leur motivation dans des domaines variés, tels que : *i)* les études pharmacologiques, en permettant l'étude systématique de l'effet d'un agent pharmacologique sur un même réseau de neurones au cours du temps ; *ii)* l'optimisation d'interfaces neuro-électroniques, en réalisant le positionnement de neurones sur des électrodes de mesure et / ou de stimulation ; *iii)* l'étude des interactions entre neurones lors du développement.

Deux stratégies principales ont été utilisées, toutes deux fondées sur la lithographie : le guidage par des reliefs tri-dimensionnels et le guidage par des contrastes d'adhésion. Si la première méthode a été sans succès, la seconde approche fut plus prometteuse. Néanmoins, ces approches ont rencontré des limitations importantes : *i)* une mauvaise survie neuronale sur le long terme ; *ii)* une perte de l'efficacité du guidage après quelques jours de culture ; *iii)* une très faible excitabilité des neurones et synaptogenèse.

I.2. Développement du protocole

Au cours de ma thèse, j'ai participé au développement d'un nouveau protocole de lithographie permettant de réaliser des réseaux de neurones de l'hippocampe d'architecture contrôlée *in vitro*. Je voudrais rappeler ici que le développement de la technique de lithographie appliquée aux cultures primaires de neurones a pris beaucoup de temps et d'énergie à beaucoup de gens. Les premiers essais ont été initiés par Didier Chatenay en 1995 lors de son année sabbatique à l'université de Rockefeller à New York. A son retour, Laurent Bourdieu et Christophe Ybert ont travaillé avec l'aide précieuse de Catherine Herr pour réaliser les cultures et réussir en 1999 les premiers positionnements des corps cellulaires et guidages satisfaisant des neurites. Dans l'été 1999, lorsque j'ai commencé ma thèse, les

premiers réseaux d'architecture contrôlée venaient d'être obtenus. Christelle Prinz, présente pour un an en tant qu'ATER au laboratoire a assuré d'abord l'élaboration de masques et la lithographie.

L'objectif initial de mon travail a consisté en la caractérisation de la physiologie des neurones dans ces réseaux afin d'optimiser le protocole de culture et de lithographie pour que les neurones dont la croissance étaient orientée aient aussi une physiologie normale. Pour suivre l'activité des cellules et mettre en évidence leur connectivité, j'ai mis en place un montage de double patch clamp couplé à l'imagerie calcique de fluorescence ; j'ai caractérisé les cellules GABAergiques et glutamatergiques par des marquages immunocytochimiques (voir chapitre II) grâce aux conseils de Lise Stoeckel dans le laboratoire de Neurophysiologie cellulaire et intégrée dirigée par M.J. Freund Mercier ; dans le même laboratoire, j'ai développé avec l'aide d'Emmanuel Jover le système de régulation du CO₂ nécessaire au suivi de la croissance des neurones sur plusieurs semaines en time lapse (voir ci dessous). Ces étapes ont été importantes pour optimiser le protocole de lithographie et de culture afin que *i*) la physiologie soit conservée pour ces neurones et *ii*) les corps cellulaires restent localisés et les neurites restent guidées par les motifs d'adhésion.

Le protocole de photolithographie est fondé sur l'établissement d'un contraste d'adhésion entre une monocouche hydrophobe recouverte de molécules de silanes fluorés et des motifs hydrophiles de poly-lysine confinant l'adhésion des corps cellulaires à de larges domaines (~100µm) et la croissance des neurites à de fines voies (2µm de large et 100µm de long). La densité est ajustée de façon à avoir un neurone en moyenne par domaine de poly-lysine.

I.3. Réalisation du protocole

Le protocole décrit en détail dans l'article ci-joint utilise des techniques standards de photolithographie pour établir sur des lamelles de verre le contraste poly-lysine / silane fluoré. Ce protocole nécessite un équipement minimum (hotte stérile, tournette pour déposer la résine photosensible, générateur de plasma d'eau). J'ai fabriqué au laboratoire les masques nécessaires à la lithographie mais ils peuvent être également obtenus commercialement. Le protocole est réalisé maintenant en quelques heures une fois par semaine, durant les jours qui précèdent chaque culture, et fonctionne de manière reproductible. Un novice l'apprend rapidement car aucune étape n'est particulièrement compliquée.

Les cultures primaires sont effectuées à partir de neurones de l'hippocampe prélevés chez l'embryon de rat selon un protocole analogue à celui développé par Banker (Banker and Goslin, 1988). Le suivi des neurones en « time lapse » m'a permis de caractériser le développement des neurones dans les réseaux sur une semaine. Dès l'ensemencement les somas des neurones ne peuvent se fixer que dans les grands domaines de polylysine ; par la suite, leurs neurites poussent sur les fines voies entre domaines. Dès 5 jours, la disposition des somas reste fixe et seules les neurites explorent le motif de polylysine. Enfin, les neurites se développent sur plusieurs semaines sans sortir des zones recouvertes de polylysine.

Avec ce nouveau protocole, le contraste d'adhésion est donc préservé sur des semaines et les neurones ne sont pas mobiles entre domaines.

I.4. Caractérisation des propriétés des neurones en réseaux d'architecture contrôlée

Pour que ce modèle constitue un nouveau système d'étude à long terme des réseaux de neurones, il était critique de montrer que les neurones pouvaient montrer les caractéristiques de neurones matures *in vitro*. Des enregistrements en Patch Clamp couplés à la détection des synapses par immunocytochimie ont démontré l'intégrité des neurones en terme de morphologie (présence de neurones GABAergiques et glutamatergiques en proportion comparable à la situation *in vivo*, entre 10 et 25%), d'excitabilité (type de motifs de décharge), de maturation des synapses (caractérisation électrophysiologique, immunologique et pharmacologique de récepteurs AMPA, NMDA et GABA-A) et de génération spontanée d'activité électrique jusqu'à 5 semaines. Ce résultat constitue un progrès important par rapport aux études précédentes et ouvre peut être la voie à des études de physiologie sur ces réseaux de neurones *in vitro*.

Conclusion

La réussite de ce protocole par rapport aux travaux précédents (Kleinfeld et al., 1988; Offenhausser et al., 1997a; Stenger et al., 1998; Matsuzawa et al., 2000; Scholl et al., 2000) réside dans l'utilisation combinée d'un protocole de culture de cellules *non mitotiques sans sérum* et de l'utilisation d'un substrat standard de culture pour favoriser l'adhésion, la polylysine. En effet, le protocole ne fonctionne plus si du sérum est présent dans le milieu de maintenance ou pour des cultures de cellules mitotiques (gliales) sans sérum dans le milieu. La plupart des travaux antérieurs avaient estimé que l'utilisation de la poly-lysine serait

délicate dans un protocole de lithographie. Nous avons adapté les étapes du protocole pour que la polylysine ne soit pas dégradée par les traitements successifs.

En ne cherchant pas des résolutions spatiales trop élevées (au maximum 2 μ m), nous avons réussi à fabriquer des motifs bien définis formant des substrats idéaux pour le guidage de la croissance neuronale.

Notre protocole, simple et robuste, peut ainsi contraindre la localisation des corps cellulaires, la croissance des neurites et favoriser la formation de synapses de proche en proche dans un réseau de neurones hippocampiques. Ainsi, on dispose d'un réseau dont on peut connaître en moyenne l'architecture (i.e. le nombre de cellules total, leur probabilité de connexion et leur nature) car on peut *a posteriori* retrouver le réseau de neurones qui a été étudié et la position des neurones inhibiteurs grâce à un marquage immunocytochimique (voir le chapitre II).

Dans le cas des réseaux d'architecture contrôlée, on définira le terme d'***architecture fonctionnelle du réseau*** par :

- 1) le nombre total de neurones ;
- 2) leur position respective dans le réseau (associée à une probabilité de formation de synapses fonctionnelles entre eux, voir chapitre IV) ;
- 3) la présence et la localisation de neurones GABAergiques.

ARTICLE PUBLIÉ
CONSTRAINED SYNAPTIC CONNECTIVITY IN FUNCTIONAL
MAMMALIAN NEURONAL NETWORKS GROWN ON PATTERNED
SURFACES

Journal of Neuroscience Methods. 2002 Jun 30;117(2):123-31.

Claire Wyart*, Christophe Ybert, Laurent Bourdieu, Catherine Herr, Christelle Prinz and Didier Chatenay. Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, U.M.R. CNRS 7506, Institut de physique, 3 rue de l'Université, 67084 Strasbourg, France.

Corresponding author : Claire Wyart, email : cwyart@ldfc.u-strasbg.fr

Key words: lithography, neuronal growth control, electrophysiology, calcium imaging, immunochemistry, orientation of connectivity.

Footnotes

* To whom reprint requests should be addressed. Email: cwyart@ldfc.u-strasbg.fr

Abstract

The use of ordered neuronal networks *in vitro* is a promising approach to study the development and the activity of small neuronal assemblies. However in previous attempts, sufficient growth control and physiological maturation of neurons could not be achieved. Here we describe an original protocol in which polylysine patterns confine the adhesion of cellular bodies to prescribed spots and the neuritic growth to thin lines. Hippocampal neurons in these networks are maintained healthy in serum free medium up to five weeks *in vitro*. Electrophysiology and immunochemistry show that neurons exhibit mature excitatory and inhibitory synapses and calcium imaging reveals spontaneous activity of neurons in isolated networks. We demonstrate that neurons in these geometrical networks form functional synapses preferentially to their first neighbors. We have therefore established a simple and robust protocol to constrain both the location of neuronal cell bodies and their pattern of connectivity. Moreover, the long term maintenance of the geometry and the physiology of the networks raises the possibility of new applications for systematic screening of pharmacological agents and for electronic to neuron devices.

1. Introduction

The ability to construct neuronal networks with a constrained synaptic connectivity and to maintain them over several weeks could open a way to new experiments which are not currently possible. Most approaches to understand information processing in biological neuronal networks use *in vivo* or brain slice preparations. A complementary approach consists in dissociated neuronal cell cultures (Banker and Goslin, 1988; Goslin and Banker, 1989) in which the structural integrity of the tissue is lost but higher degree of biochemical and biophysical control is possible. For example, culture systems enable to simultaneously record the activity of groups of 3-4 connected neurons in an isolated network (Fitzsimonds et al., 1997; Bi and Poo, 1998) and to study the long term effect of molecules applied in the medium (Turrigiano et al., 1998). However, in standard cultures, the random spatial distribution, the overlap of neurites and the motion of neurons on the homogeneous substrate complicate the observation of a single neuron over long time (Lo and Poo, 1994).

Directed neuronal networks *in vitro*, obtained by confining soma location and neurite elongation to a prescribed pattern, should allow to circumvent these difficulties. By immobilizing cell bodies in defined positions, the technique would facilitate the study of individual neurons and of their interaction with their neighbors during the development of the network over weeks. It may be then feasible to monitor and stimulate neuronal activity by forming artificial neuronal circuits using neuron to electronic interfaces (Offenhausser et al., 1997a; Zeck and Fromherz, 2001). This development requires that neurons fulfill four essential conditions : *i*) long term persistency of their growth pattern and low density survival *in vitro*, *ii*) physiological integrity, *iii*) presence of both inhibitory and excitatory neurons, *iv*) maturity of synapses.

Patterning technologies use mainly lithography and self-assembled monolayers (Kleinfeld et al., 1988; Offenhausser et al., 1997b; Ma et al., 1998; Stenger et al., 1998; Wheeler et al., 1999). Photolithographic protocols consist usually in grafting two silane molecules with antagonistic action on cellular growth onto glass slides with a micron scale resolution. Some growth permissive molecules (e.g. an aminosilane or laminin-derived synthetic peptide) (Matsuzawa et al., 2000; Scholl et al., 2000) favor neuron adhesion and growth whereas antipermissive molecules such as fluorosilanes prevent it. In previous studies, several problems have emerged. In early studies, survival was only obtained in high density systems (Kleinfeld et al., 1988). In other attempts, synapses did not achieve a mature state (Offenhausser et al., 1997b). Sometimes loss of order was observed when neurons gained excitability (Stenger et al., 1998). In a recent study, although synapses were observed,

neuronal excitability was altered as shown by the depolarized value of resting potentials and by the firing patterns showing a single action potential (Matsuzawa et al., 2000). Moreover survival was limited to less than ten days : these neurons did not live beyond the critical survival step often described in low density cultures (Goslin and Banker, 1991).

The present work describes an original protocol for controlling neuronal growth on solid substrates allowing us to obtain mature and durable neural networks of controlled architecture. Its achievement is based on *i*) the use of polylysine instead of an aminosilane as the permissive molecule and *ii*) the optimization of low density culture conditions in a define medium in order to observe spontaneous activity and mature synapses up to 5 weeks *in vitro*. We designed with hippocampal neurons a wide variety of neuronal networks which maintain their spatial structure over a month. We restrained our study to neuronal networks grown between 2 and 3 weeks *in vitro*. At this stage, neuronal physiology is intact. Patch clamp recordings show that neuronal excitability is similar to the one observed in slices. Immunocytochemistry and electrophysiology reveal that both excitatory and inhibitory neurons form functional synapses. Whole cell recording and calcium imaging show that small networks express spontaneously collective activity. Characterization of neuronal connectivity with a double patch clamp approach demonstrates that connectivity is constrained by the geometry, since neurons preferentially form synapses to their first neighboring neurons.

2. Methods

2.1. Photolithography

Cleaned coverslips are coated with hydrophobic fluorosilane $C_8H_4Cl_3F_{13}Si$ (Roth, France) in dichloromethane and n-decane half an hour at $4^\circ C$. After rinsing in chloroform, the silanized surfaces are spin-coated with a positive photoresist. Each coverslip is pressed against a mask and exposed to UV light. Incubation in a development bath removes the exposed photoresist. The fluorosilane layer (no longer protected by the photoresist) is removed with an H_2O plasma and the glass surface is then coated with poly-D-lysine (Sigma P2636, 1mg/ml overnight). The next day, unexposed photoresist is washed out with acetone. To optimize our protocol, several geometrical parameters have been tested. Survival is enhanced with large polylysine domains (typically 80 to $100\mu m$ wide) in comparison with smaller ones (e.g. $40\mu m$ wide or less). Connecting lines of width 2 to $5\mu m$ provide the best guidance to neurites while preventing the attachment of cell bodies. Masks for lithography are easily prepared in the laboratory. Any desired pattern is drawn using a standard graphic software. A photograph of the printed pattern is used as a first reduction. It is then reduced to its final size by projecting

it about 100 times onto a photoresist coated coverslip placed at the focal plane of a 20X Plan Neofluar Zeiss objective, by transient opening of a shutter and appropriate displacement of a motorized stage. After a standard metallization procedure, we obtain typically 100 chromium patterns on a coverslip with a final size for each pattern of 0.8 mm and with a 2-4 μ m resolution.

2.2. Cell culture

Pyramidal neurons from rat hippocampus are grown on the substrates according to the protocol derived from Banker (Goslin and Banker, 1991). Patterned coverslips are incubated for 5 days in neuron plating medium (NPM) containing 10% Horse Serum (Invitrogen). Hippocampi from E18 rats embryos are dissociated chemically (0.25% trypsin, 20 minutes) and mechanically using fire polished Pasteur pipettes. Neurons plated on the patterned substrates (densities ranging from 1000 to 10000 cells per cm²) are maintained in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. After 4 hours, NPM is replaced by a serum free maintenance medium (NMM) and a feeding layer of glial cells is added to each dish. Glial cells proliferation in the culture is stopped by AraC after 2 days (1 μ g/ml, Sigma). Standard glass coverslips (Marienfeld, Germany) used as controls are cleaned in nitric acid overnight, rinsed thoroughly in water and dried 6 hours at 220°C. Coating with polylysine and incubation in NPM occur in the same conditions as for the patterned coverslips. We have also tested different conditions of maintenance and different glial cells contents. Hippocampal cells grown in serum containing medium together with glial cells (Wilcox et al., 1994), were not successfully constrained on the patterns after 3 days. Similarly, glial cells plated at high density (~30 000 cells/cm²) in serum containing medium will eventually spread out of the patterns and cover fluorosilane coated regions. But glial cells plated at low density (2500 cells/cm²) in serum free medium remain confined on patterns. Our lithography protocol is hence well adapted to cultures of neurons and of dividing cells, as long as the growth medium is serum free. Serum is incompatible with long term patterning since *i*) it favors cells division and growth and *ii*) serum proteins may bind through hydrophobic domains to fluorosilanes.

2.3. Electrophysiology

Cultures were studied at room temperature after 2 to 3 weeks *in vitro*. Patch clamp records were performed using two Axopatch 200B. Bath solution contained in mM 145 NaCl/ 3 KCl/ 3 CaCl₂/ 1 MgCl₂/ 10 Glucose/ 10 HEPES/ pH=7,25, and osmolarity adjusted to 315 mOsm. Pipette solution contained in mM 9 NaCl/ 136.5 KGlu/ 17.5 KCl/ 0.5 CaCl₂/ 1 MgCl₂/ 10

HEPES/ 0.2 EGTA/ pH=7,25 and osmolarity equal to 310 mOsm. Patch pipettes were made of borosilicate tubes (Clarks, UK) and had a resistance of 3-4M Ω when filled with the standard pipette solution. The series resistance was less than 10-12M Ω , and was compensated up to 60% using a standard procedure. Resting membrane potentials were estimated directly after entering in whole cell conuration. In some experiments the following transmitter antagonists (from Sigma) were applied in the bath : 1 μ M bicuculine methiodide to block GABA_A receptor, 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) for non NMDA receptors and 50 μ M amino-5-phosphopentanoic acid (AP5) for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Firing patterns were assayed with all antagonists in the bath and no calcium buffer in the pipette.

2.4. Antibodies

Monoclonal antibody MAB363 specific for NMDAR1 subunit of the NMDA receptor was obtained from Chemicon (Temecula) and used at a 1 : 1000 dilution. MAb GAD-6 specific for GAD 65 (Boehringer Mannheim) was used at a 1 : 400 dilution. Mab specific for synaptotagmin was a gift from E. Jover (Strasbourg) and used at a 1 : 4 000 dilution. Rabbit polyclonal antibodies against synaptophysin kindly given by L. Stoeckel (Strasbourg) and GABA (SIGMA, reference A2052) were used at the dilution 1 : 1 000 and 1 : 10 000 respectively. Secondary antibodies obtained from Molecular Probes were IgG anti mouse coupled to Alexa Green or anti rabbit coupled to Cy3 both used at 1: 400 dilution.

2.5. Immunocytochemistry

Neurons were fixed with 4% formaldehyde, 4% sucrose in PBS for 15 min at 37°C (except for NR1 staining where 10 minutes methanol fixation at -20°C is used) and permeabilized with 0.25% Triton X-100 for 5 min. After preincubation in 10% serum of secondary antibodies species for 30 min, cultures were incubated with primary antibody(ies) overnight at 4°C. For double labeling experiments, both primary antibodies were incubated together. Controls include incubations with no primary antibody and comparisons of double- and single-labeled samples to ensure that the labeling was independent in the double-label experiments.

2.6. Calcium imaging

Cultures were loaded with 5 μ M of the membrane-permeant acetoxymethyl ester of Fura 2 AM (Molecular Probes, Oregon) for 30 min at room temperature and then rinsed for 30 min. A 100W Xenon lamp filtered at 380nm ensured excitation of the probe, emission was filtered at 510nm. Images obtained with a CCD (Roper Scientific) were acquired at 50Hz, stored and analyzed using Metamorph in order to measure the fluorescence intensity variation in all cellular bodies selected in the network.

All values are given +/- standard deviation.

3. Results

3.1. Adhesion, growth and morphology of neurons

Polylysine, a polymer of basic amino acids, is commonly used to promote cell adhesion. It was thought to be difficult to pattern by lithography because of its size and the resulting thickness of the layer on glass (Stenger et al., 1998). Our strategy to pattern polylysine (see Methods) relies on the use of an H₂O plasma to clean the surface prior to polylysine deposit and on the removal of the unexposed photoresist with acetone which does not degrade the coated polylysine.

We obtain micron scale patterns of polylysine which target cellular bodies and guide neurites to form spatially directed neuronal networks (Fig. I-1A). A wide diversity of patterns has been designed to form autapses, linear networks, matrices and stars (some shown Fig. I-1B). In the patterns (Fig. I-1B), neuronal somata adhere to the 100 μ m wide spots of polylysine (square or disk) but not to the polylysine lines connecting two spots because of their thinness (2-4 μ m wide). Neurite elongation occurs in spots and thin lines (100 μ m long). We can direct cell body adhesion and neuritic growth within certain geometrical conditions (see Materials and Methods). Somatic adhesion sites have to be at least ~80 μ m in diameter. The width of polylysine lines should be inferior to 10 μ m in order to allow neurites elongation and to prevent cell body adhesion. Their length was set to ~100 μ m to allow formation of connections and to maintain good neuronal survival (Ikegaya et al., 2000).

The number of cells per domain is determined through the plating density, thereby fluctuates from one pattern to the next. We adjusted plating density in order to have an average of one cell per spot (Fig. I-1B). The pattern is respected by neurons in serum free medium *in vitro* for five weeks. During that period cells do not escape from polylysine spots,

so that each neuron can be followed in a given pattern over time. The neuronal morphology (Fig. I-1B) is similar to the one observed in classical low density cultures (Goslin and Banker, 1991). We studied neurons between 2 and 3 weeks *in vitro*, when they exhibit a large number of neurites (Fig. I-1B).

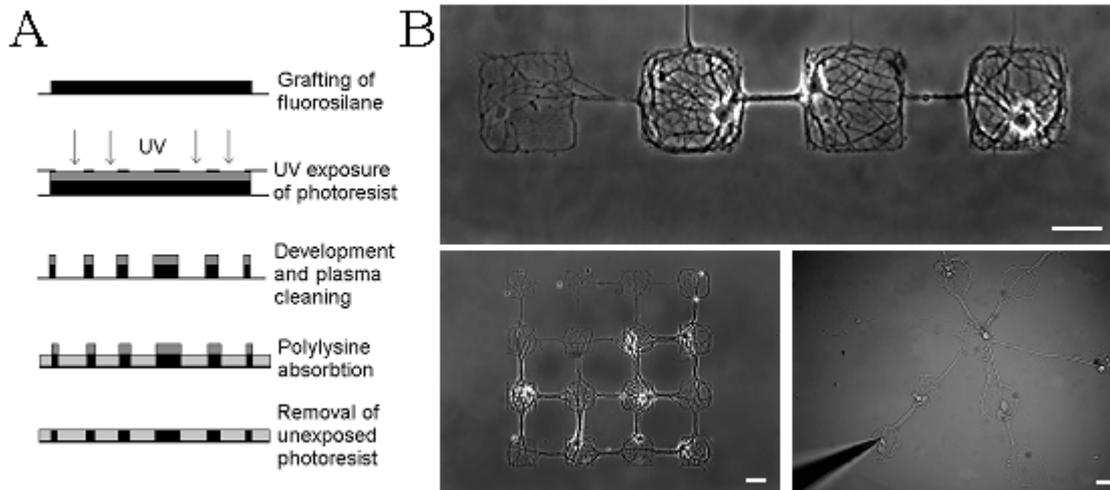


Figure I-1. Protocol and images of the pattern. **A. Protocol of photolithography.** A glass coverslip (continuous line) is coated with domains of fluorosilane molecules (dark) and with regions of polylysine (light gray) according to the pattern designed on the mask (dashed line), using UV exposure of a spincoated photoresist (gray) (see Methods). **B.** Images of neural networks of controlled architecture. Top: linear network. Bottom left: matrix 4x4. Bottom right: star. Cell bodies of neurons are restricted to squares or disks of 80µm and neurites to lines (80µm length, 2-4µm wide). Square and disk diameters are 80µm for each figure. Scale bar is 50µm.

3.2. Electrophysiological characteristics of neurons are intact

Electrophysiological properties of neurons grown on patterned substrates are similar to those observed in classical “random” low density cultures. Using patch clamp (in the whole cell configuration), we evaluated and compared membrane properties and firing patterns of neurons in both systems. As shown in Fig. I-2A, there is no difference in resistance, capacitance and time constant of the membrane between culture types. In all cases, membrane resistance ranges approximately between 100MΩ and 1GΩ (239 MΩ +/-17 MΩ) as observed in standard cultures (217= +/-28 MΩ; see also Evans et al., 1998). To evaluate cells excitability, resting potential and firing patterns were compared in standard and patterned cultures. Resting membrane potentials vary between -50mV and -60mV in both culture types (-55,6 +/- 2,3mV for standard low density cultures and - 58,7 +/- 1,8mV for patterned cultures) and the firing patterns are similar (Fig. I-2B). In response to a 800ms depolarizing pulse, neurons usually discharge multiple action potentials which habituate. A smaller fraction

(18% for patterned cultures (n=52) and 17% for classical cultures (n=31), see Fig. I-2B) exhibits a single spike response. All current-evoked action potentials disappear after extracellular application of 0.5 μ M tetrodotoxin (TTX, n=7). The similarity of these results with those obtained in acute slices (Staley et al., 1992) demonstrates the integrity of the membrane and of the excitability of our neurons.

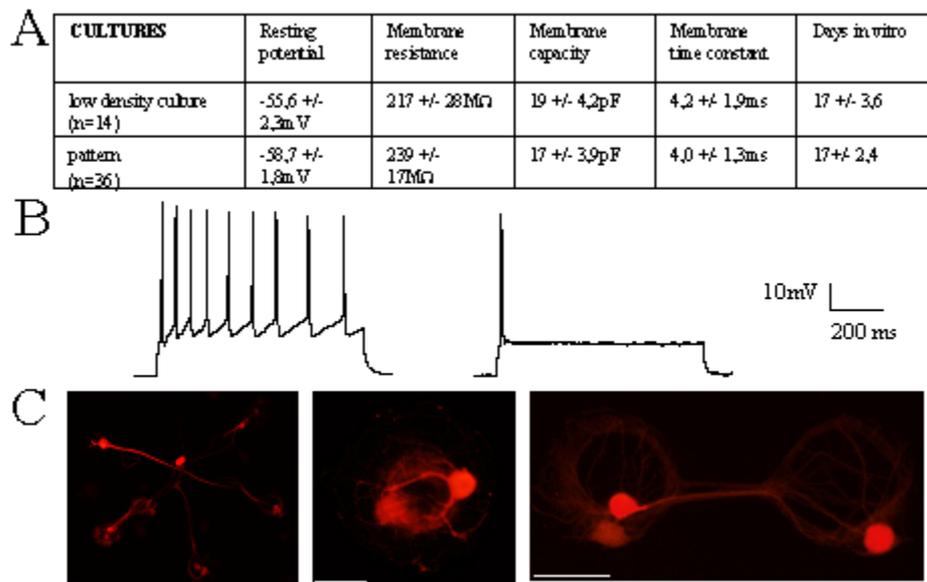


Figure I-2. Physiology of neurons grown on polylysine patterns is similar to the one observed for neurons grown in standard low density cultures. **A.** Membrane biophysical properties. **B.** Firing patterns observed in both cultures after a depolarizing step of 800ms with CNQX and bicuculline added to the bath. **C.** Detection of inhibitory neurons by immunocytochemistry using anti-GABA antibody. Scale bar is 50 μ m.

3.3. Inhibitory and excitatory cells are both present

We observe both GABAergic, identified by immunoreactivity for GABA (Craig et al., 1996), and non GABAergic, presumably glutamatergic, neurons (Fig. I-2C). The patterned neuronal networks are slightly enriched in GABAergic cells (27% of the overall population in patterns (n=432) while 22% in standard cultures (n=513). We conclude that both inhibitory and excitatory neurons grow on patterned networks. But do they form an interconnected neuronal network? The presence of synapses was assayed by immunostaining with antibodies against marker proteins of presynaptic specializations, synaptophysin and synaptotagmin. Immunoreactivity for each protein is distributed in clusters, corresponding presumably to synapses spread all over the networks (Fig. I-3B). We now show evidence for functional synapses by recording spontaneous synaptic currents.

3.4. Neurons form mature inhibitory and excitatory synapses

Whole cell recordings reveal spontaneous (excitatory and inhibitory) synaptic currents (Fig. I-3A) distinguished by their reversal potential and by specific pharmacological agents sensitivity. Inhibitory Post Synaptic Currents (IPSCs) are sensitive to the GABA_A receptor antagonist bicuculline methiodide (1 μ M) and reverse polarity near -45 mV. Their decay time constant is 45 ± 7 ms. Excitatory Post Synaptic Currents (EPSCs) are sensitive to 10 μ M CNQX, which blocks α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptor. These currents reverse near 0mV (1.1 ± 2.3 mV) and their decay time constant is 2.0 ± 0.7 ms. The reversion values are coherent with the ionic concentrations (see Methods) and the currents kinetics with those observed in slices (Pettit and Augustine, 2000) or dissociated cultures (Wilcox et al., 1994; Evans et al., 1998).

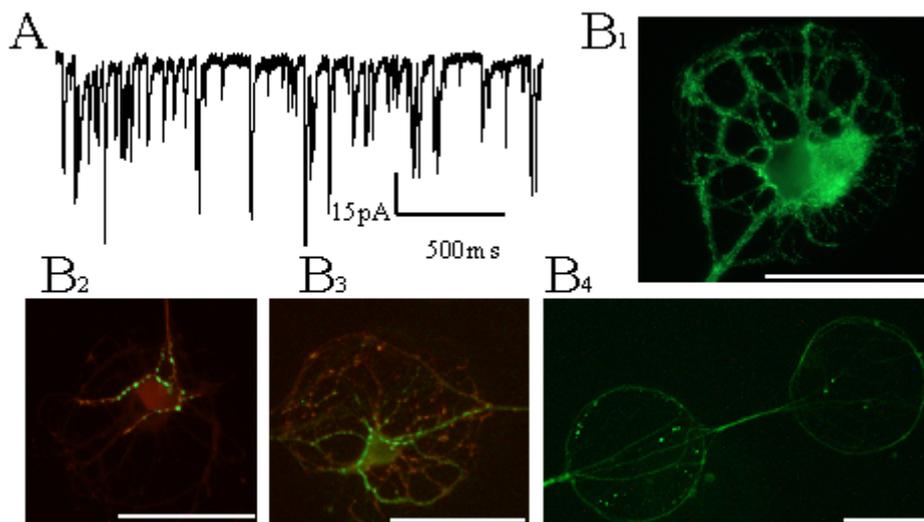


Figure I-3. Evidence for mature synapses between neurons. **A.** Spontaneous synaptic currents recorded in voltage clamp mode (voltage holding -60 mV). **B.** Localization of inhibitory and excitatory synapses in the networks with **B1.** Anti-synaptotagmin; **B2.** Anti-GAD 65 (green) and anti-GABA (red); **B3.** Anti-GAD 65 (green) and anti-synaptophysin (red); **B4.** Anti-NR1. Scale bar is 50 μ m.

We attempted to compare qualitatively the distribution of inhibitory and excitatory synapses. Immunocytochemistry for Glutamate Acid Decarboxylase 65 (GAD 65, which stains cell bodies and synaptic terminals of inhibitory cells) shows that inhibitory synapses are concentrated around the cellular bodies of excitatory neurons (Fig. I-3B) more than on neurites (inhibitory synapses on cell bodies of inhibitory neurons can not be identified since GAD 65 staining is very dense in these cell bodies). On the other hand, NMDA receptor positive synapses revealed by staining for NR1 (NMDA receptor subunit 1 common to all NMDA receptors, expressed by all neurons) are widely distributed on neurites (Fig. I-3B). Both GAD and NR1 staining match the labeling observed on “mature” neurons in culture (Pickard et al., 2000).

3.5. Orientation of connectivity between neurons in designed networks

Neurons do form mature synapses on the patterned surface : does cellular location influence synaptic connectivity ? In particular, do neurons form synapses preferentially with their nearest neighbors located on adjacent spots in the patterned networks ? To answer this question, double patch recordings were made from pairs of neurons, either first (Fig. I-4A1) or second (Fig. I-4A2) order neighbors, to evaluate the probability of connection in both cases. The pre-synaptic neuron was recorded in current clamp mode so that an action potential could be elicited with a depolarizing pulse. The post-synaptic cell was initially voltage clamped at -60mV .

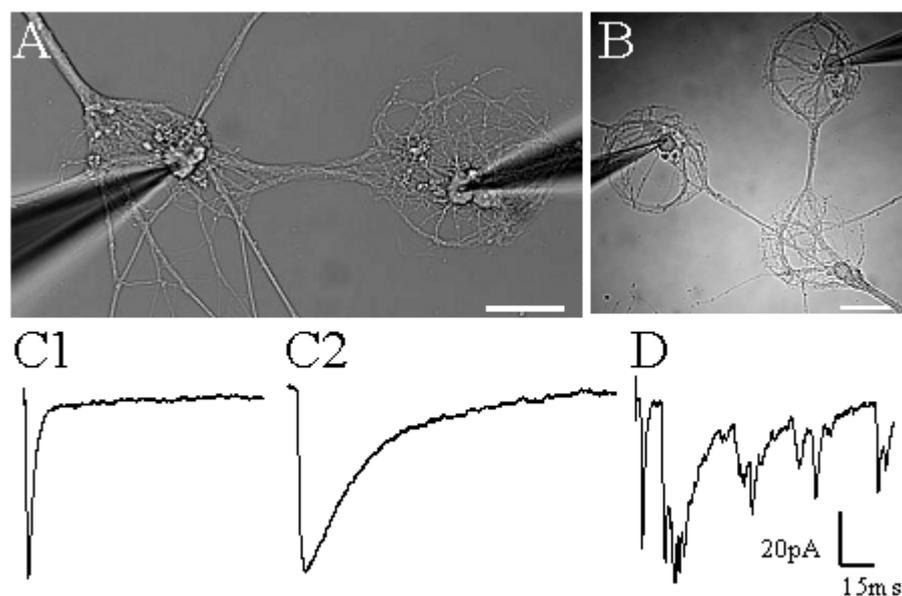


Figure I-4. Evoked synaptic currents between first order neighboring neurons in the patterns. A-B. Double patch of first (A) and second (B) order neighboring neurons. C. Example of typical excitatory (C1) and inhibitory (C2) mono-synaptic evoked current in the post-synaptic cell. D. Example of a response with mono-synaptic and poly-synaptic components. Scale bar is $50\mu\text{m}$.

We first performed double recordings of first order neighboring neurons (Fig. I-4A1). In 37 out of 42 neurons tested, we observe evoked synaptic currents (Fig. I-4 B₁, B₂, C). In 11 neurons (Fig. I-4B₂) IPSCs are systematically recorded and characterized by an inversion potential near -43mV and a reversible blockage by the bicuculline methiodide ($1\mu\text{M}$). The time delay of the response ($4,1\pm 1,3\text{ ms}$) and the absence of failure demonstrate their mono-synaptic nature. Action potential induced in 26 neurons elicits with almost no failure EPSCs which reverse near $2,0\pm 3,1\text{mV}$ (Fig I-4B₁). EPSCs occur with a constant latency ($3,9\pm 0,8\text{ ms}$) and are abolished by application of $10\mu\text{M}$ CNQX revealing an AMPA-type receptors

component. In 23 records, we observe after a monosynaptic EPSC synaptic currents with a longer time delay ($>10\text{ms}$), a low occurrence probability (39%) and usually a complex shape (Fig. I-4C). These presumably poly-synaptic currents are always abolished by $10\mu\text{M}$ CNQX application revealing the excitatory *relais*.

Regarding second order neurons (Fig. I-4A2), no evoked currents were observed in 62% of the cases ($n=8$). In the other cases (38%), we measured either inhibitory ($n=2$) or excitatory ($n=3$) mono-synaptic connections. The probability for mono-synaptic connections between first order network (87%) is thus very high and about twice the probability for second order connections (38%). Therefore, the connectivity between neurons in the patterned network does not occur randomly but is orientated by the geometry of the pattern. This last feature is the most fascinating property of our networks since it makes connectivity between neurons predictable to some extent considering the geometry of the networks.

We asked whether connectivity could be strictly restricted to first neighbor at earlier stage of development of the networks. We tested connectivity between 3 pairs of second neighboring neurons in 1-2 weeks old cultures and observed that monosynaptic connectivity between second order neighboring neurons could be already observed at this stage (in 3 cases out of 6 pairs tested). Moreover time lapse experiments in a 5% CO_2 37°C chamber over the first week of culture has revealed that after 5-7 days of culture -when we start to record spontaneous currents neurons in the networks- neurons can already grow neurites to first, second and third neighboring neurons. These observations suggest that the time dependencies of large scale neurites elongation and synapses formation explain why we have not been able to observed, even after one week of culture, restricted monosynaptic connectivity to first neighbors. Therefore it is indeed very satisfactory that connectivity is still orientated by the architecture in mature networks.

3.6. Spontaneous activity during development

Current clamp experiments show that TTX sensitive spikes could be induced after 3 days *in vitro*. Spontaneous postsynaptic potentials appear between 4 to 7 days. Cell attached experiments show that both the number of spontaneously active cells and their rate of discharge increased with time. After 3 weeks *in vitro*, spontaneous action potentials often appear in bursts (Fig. I-5B). This bursting activity is blocked by application of $10\mu\text{M}$ CNQX (*not shown*). To probe whether spontaneous activity occurs simultaneously throughout the network, we used calcium imaging with Fura 2 AM probes (Fig. I-5A) (Smetters et al., 1999; Peterlin et al., 2000; Mao et al., 2001; Cossart et al., 2003). Single action potential triggers an

increase in intracellular calcium concentration in the soma which causes a decrease of fluorescence intensity (with a time to peak of 10-20ms and a time decay of about 1s). We measured fluorescence intensity over all neurons of the network every 20ms (Fig. I-5A). We observed that calcium increases in all neurons of the network during a burst of action potentials (Fig. I-5C). These data suggest that all neurons are usually active during a burst.

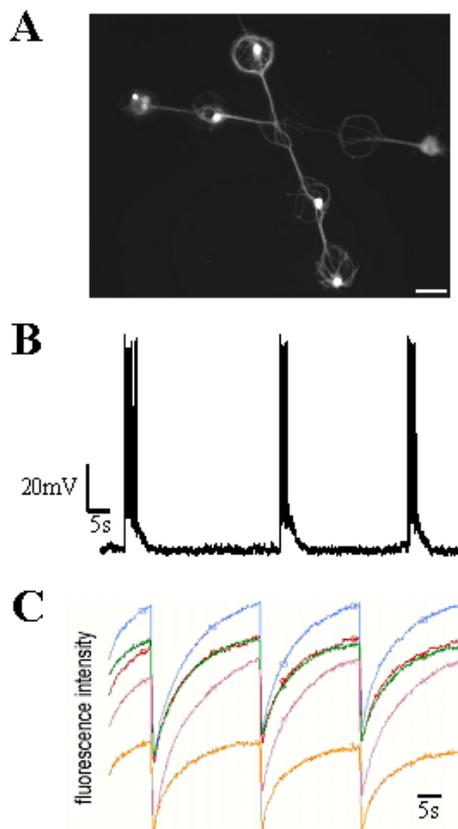


Figure I-5. Spontaneous activity in neurons of a mature (23 days old) network. **A.** Image of neurons in a network after Fura 2 AM loading. **B.** Whole cell recording of one neuron in the pattern showing repetitive bursts of action potential. **C.** Bursting activity occurs in all neurons of the network revealed by the simultaneous decrease of fluorescence. Whole cell recording and calcium imaging in these examples were not simultaneously acquired.

We have seen that in patterned networks spontaneous activity evolves with time from random isolated spikes to bursting spike formation. Bursts of spontaneous action potentials cause simultaneous calcium transients in all neurons of the network. This might be compared to what has been seen for cortical dissociated cultures and in young slices (Muramoto et al., 1993; Feller, 1999).

4. Discussion

Our protocol is a robust and very accessible way to produce *mature ordered* neuronal networks with intact neuronal physiology. Indeed, for at least 5 weeks, the geometry of the network and the membrane properties of both excitatory and inhibitory cells are maintained and functionally mature synapses do form. Different observations indicate that inhibitory and excitatory synapses are mature: *i*) clusters of presynaptic markers, *ii*) specific localization of

inhibitory and excitatory synapses; *iii*) voltage clamp recordings of spontaneous EPSCs and IPSCs with standard current kinetics and pharmacology. Synaptic connectivity between pairs of neurons and spontaneous activity are similar to what has been observed between pyramidal neurons in slices (Markram et al., 1997; Feller, 1999) and may reflect a general property of neuronal networks organization.

Moreover synaptic connectivity can be easily assayed in designed networks, as shown in this paper, and appeared to be constrained by geometry. Because of the simplicity of identification and study over time of given connected neurons, we believe that the design of these mature ordered networks may constitute a novel tool to study over long period interactions between multiple neurons in a network.

Our technique maintains about a hundred of networks per glass coverslip in a defined medium. The main advantages of these neuronal chips are the fixed position of the cellular bodies, the maturation of the neurons, the simplicity of the connectivity patterns and finally the long term maintenance of the networks in a serum free media. These properties could be of great interest to systematically screen new pharmacological compounds at different stages of neuronal development.

Two main perspectives could be reached by successive lithographies : *i*) the grafting of different molecules onto the substrates could permit further refinement of constructed networks (to orientate inhibitory or excitatory cells adhesion or axonal or dendritic growth); *ii*) the coating of electrodes on the surface in order to stimulate and record from all neurons of the network over time. The realization of neuron to electronic devices (Zeck and Fromherz, 2001) with mammalian neurons may be then greatly facilitated by our technique.

Finally our protocol has succeeded in designing patterns with non dividing cells (neurons) as well as dividing cells (astrocytes) thus making them suitable to form hybrid assemblies and study specific interactions between different types of mammalian cells (such as motoneurons and muscular fibers or tumoral and non-tumoral cells considered to be more easy to maintain *in vitro*).

Acknowledgments.

We thank Richard Miles, Samuel Wang and Ann Marie Craig for useful comments on the manuscript. Albert Libchaber is acknowledged for his support at the initiation of the project. This work has been supported by the "Université Louis Pasteur, Strasbourg" (contrat exceptionnel 2001), the "Ministère de la Recherche" (ACI jeune chercheur 1999), the CNRS (Projet jeune chercheur 1999) and DRET (contrat n° 961179, 1996).

II. METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE SPONTANEE ET DE DETECTION DES NEURONES INHIBITEURS

L'étude de l'activité spontanée requiert l'utilisation de méthodes non invasives. Nous avons utilisé deux techniques : le patch clamp en mode cellule attachée et l'imagerie calcique.

Les petits réseaux d'architecture contrôlée montrent après deux semaines des augmentations de la concentration de calcium intracellulaire reflétant la mise en place d'une activité spontanée collective complexe (Figure II-1). Notre approche a consisté à coupler une caractérisation globale de l'activité spontanée collective en imagerie calcique avec des enregistrements de cellules individuelles dans le réseau, en Patch Clamp mode cellule attachée. Ceci nous a en effet permis d'enregistrer l'activité d'un neurone sur des temps longs sans modifier le milieu intra-cellulaire. La structure fonctionnelle des réseaux a été déterminée en réalisant avant chaque expérience une image DIC afin de déterminer le nombre de neurones et leur position. La nature inhibitrice (I) / excitatrice (E) des neurones a été établie après fixation par immuno-cytochimie avec des anticorps Anti GAD et Anti GABA.

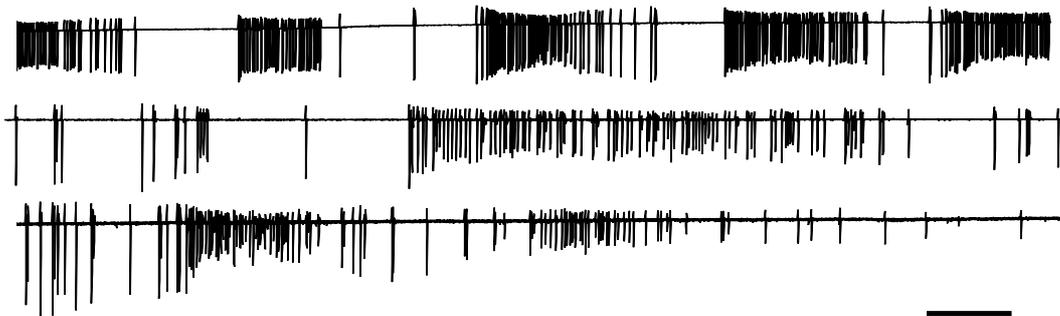


Figure II-1. Enregistrement en configuration cellule attachée d'une cellule d'un réseau de 10 cellules à trois semaines. Des bouffées de potentiels d'action s'alternent avec des périodes de grand silence et des potentiels d'action isolés. L'échelle de temps nous montre que des enregistrements de longue durée (de 15minutes environ) sont nécessaires pour caractériser l'activité spontanée. Echelle horizontale : 2 min.

II.1. Estimation des potentiels d'action par la technique de patch clamp en configuration cellule attachée

Lorsqu'elle est enregistrée en patch clamp en configuration cellule entière, une cellule subit une dialyse importante et rapide (5-10 min) de son contenu intracellulaire. Dans le cas d'une autapse, cette dialyse empêche l'expression d'activité spontanée. Dans les réseaux de neurones, l'activité spontanée persiste mais elle pourrait être perturbée par la dialyse du contenu intracellulaire. Afin d'étudier l'activité spontanée des neurones de nos réseaux sans l'effet de dialyse et avec une bonne résolution temporelle, nous avons eu recours à la technique de patch clamp en configuration cellule attachée.

II.1.1 Principe : une mesure extracellulaire

Une pipette de patch de résistance 3 à 5 MΩ est appliquée contre la membrane du neurone. Une aspiration est maintenue jusqu'à formation d'un contact avec une résistance de l'ordre du giga Ohm nommé « giga seal » (voir schéma Fig. II-2A). On procède à l'enregistrement dans cette configuration sans perforer la membrane, et donc sans dialyser le contenu de la cellule. Nous mesurons en extracellulaire les courants conséquents aux variations du potentiel de membrane et nous allons voir que les courants associés à un potentiel d'action peuvent être estimés ainsi.

II.1.2. La mesure proportionnelle au potentiel de membrane ou à sa dérivée

Le schéma équivalent de la cellule enregistrée en mode cellule attachée est représentée sur la figure II-2B. La fraction de membrane sous la pipette est caractérisée par une capacité membranaire c et une résistance r que l'on peut estimer. En effet, pour une pipette classique, la taille de l'extrémité est de l'ordre de $1\mu\text{m}$ et la surface s sous la pointe de la pipette est d'environ $1\mu\text{m}^2$. Connaissant la capacité spécifique d'une cellule, c_s , la capacité c est égale à :

$$c = c_s \times s \quad (1)$$

A.N. $c = 1\mu\text{F} / \text{cm}^2 \times 10^{-8} \text{cm}^2 = 10^{-14} \text{F}$.

Si l'on suppose que la cellule, de surface S_{totale} , a une membrane homogène de résistivité r , et que l'on appelle C_m sa capacité membranaire et R_m sa résistance, on a :

$$r = R_m \times S_{\text{totale}} \quad (2)$$

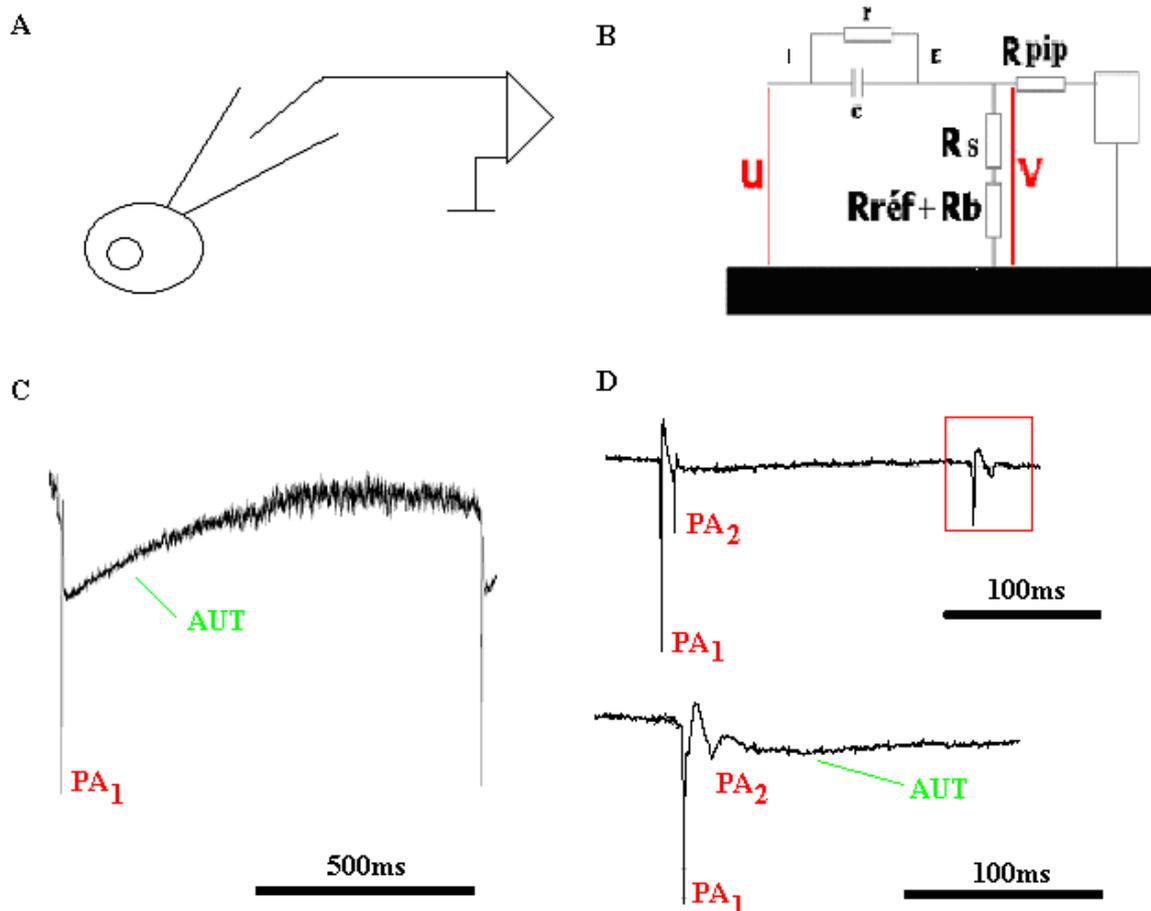


Figure II-2. Principe et mesure en patch clamp dans la configuration cellule attachée. **A.** La pipette de patch clamp d'une résistance de 3 à 5 MΩ est appliquée contre la membrane. L'aspiration par succion est maintenue jusqu'à l'obtention d'un giga seal d'une résistance au moins égale à 1GΩ. **B.** Circuit équivalent du montage. Expérimentalement nous avons accès au potentiel V à la pointe de la pipette. La relation entre le potentiel intracellulaire U et V est donnée par le pont diviseur de tension entre U et V. En fonction de la fréquence caractéristique du signal biologique, V sera proportionnel à la dérivée du potentiel U ou directement à U (voir texte). **C.** et **D.** Signaux typiques enregistrés pour une cellule isolée mature (C, 29DIV) ou jeune (D, 17DIV). La discrimination des potentiels d'action et de l'autapse est indiquée par les annotations PA et AUT respectivement.

Et on calcule la surface totale de la cellule comme étant :

$$S_{\text{totale}} = \frac{C_m}{c_s} \quad (3)$$

A.N. : On mesure expérimentalement une capacité de membrane $C_m = 20\text{pF}$. On a donc $S_{\text{totale}} = 20\text{pF} / (1 \mu\text{F}/\text{cm}^2) = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$.

On en déduit la résistance r :

$$r = \frac{R_m S_{\text{totale}}}{s} \quad (4)$$

A.N. : $r = 200 \text{ M}\Omega \cdot 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 / 10^{-8} \text{ cm}^2 = 4 \cdot 10^{11} \Omega$

Si on fait l'approximation que la cellule est assimilable à un seul compartiment électrotonique, la constante de temps τ de la fraction de membrane plasmique sous la pipette est égale à la constante de temps de la membrane entière soit :

$$\tau = R_m C_m = 1 / 2\pi \nu_m = r c \quad (5)$$

avec $1 / 2\pi\tau = \nu_m$ la fréquence caractéristique de la membrane. On mesure expérimentalement une constante τ de l'ordre de 4ms soit une fréquence caractéristique $\nu_m = 40\text{Hz}$.

Dans la configuration cellule attachée, on a accès au potentiel V à la pointe de la pipette. L'existence d'un pont diviseur de tension entre V et le potentiel U à l'intérieur de la cellule nous permet d'écrire la relation suivante (voir Fig.II-2B) :

$$\frac{V}{U} = \frac{R_s + R_{ref} + R_b}{R_s + R_{ref} + R_b + \frac{r}{1 + jrc2\pi\nu}} \quad (6)$$

où R_b et R_{ref} sont les résistances du bain et de la référence.

Les résistances R_b et R_{ref} étant très faibles par rapport à la résistance R_s du contact entre la pipette et la membrane (de l'ordre du gigaOhm), l'équation (6) se simplifie :

$$\frac{V}{U} = \frac{R_s}{R_s + \frac{r}{1 + jrc2\pi\nu}} \quad (6')$$

Lorsqu'une variation de potentiel a lieu sur la fraction de membrane, elle entraîne un courant capacitif transitoire à travers la capacité c et un courant à travers la résistance r (voir fig.II-2B). Le circuit équivalent de part et d'autre de la fraction de membrane sous la pipette est caractérisé par une impédance complexe z :

$$z = \frac{1}{1/r + jc2\pi\nu} = \frac{r}{1 + jcr2\pi\nu} = \frac{r}{1 + j\nu / \nu_m} \quad (7)$$

II.1.2.1. Pour des signaux de fréquence $\nu \gg \nu_m = 40\text{Hz}$

On a :

$$z = \frac{r\nu_m}{j\nu} = \frac{1}{jc2\pi\nu} \quad (8)$$

et

$$\frac{V}{U} = \frac{R_s}{R_s + \frac{1}{jc2\pi\nu}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{jR_s c 2\pi\nu}} \quad (9)$$

On peut simplifier cette expression en considérant les valeurs des fréquences ν et $f_0 = 1/2\pi R_s c$ dans nos conditions expérimentales. Puisque $R_s c = 10^{+9} \Omega 10^{-14} \text{F} = 10^{-5} \text{s}$, on a $f_0 \sim 15$

kHz. Les signaux électriques que nous cherchons à mesurer apparaissent toujours à une fréquence ν largement inférieure à 15kHz. Ainsi l'équation (9) devient :

$$\frac{V}{U} = jR_s c 2\pi\nu \quad (10)$$

Si on écrit U sous la forme d'une fonction exponentielle $U \sim e^{j2\pi\nu t}$, le signal V auquel on a accès est proportionnel à la dérivée du potentiel U :

$$V = jR_s c 2\pi\nu U = R_s c \frac{dU}{dt} \quad (11)$$

II.1.2.2. Pour des signaux de fréquence $f \ll \nu_m = 40\text{Hz}$

On a :

$$z = r$$

$$\frac{V}{U} = \frac{R_s}{R_s + r} \sim \frac{R_s}{r} \quad (12)$$

V est alors directement proportionnel au potentiel U mais atténué. Le facteur d'atténuation donné par le rapport de R_s / r est de $2,5 \cdot 10^{-3}$.

II.1.3. Calcul du signal mesuré en mode Voltage Clamp

Dans une configuration cellule attachée dans le mode voltage clamp, nous mesurons un signal à travers l'électrode chlorurée dans la pipette de résistance R_p . Pour maintenir le potentiel constant, notre amplificateur fait office de générateur : il génère un courant égal et opposé à celui qui passe par le patch de membrane I_p . I_p est donné par la loi d'Ohm soit :

$$I_p = V / R_p \quad (13)$$

II.1.3.1. Pour un potentiel d'action

Un potentiel d'action correspond à une dépolarisation de la membrane d'environ +100mV en 1 ms. Nous sommes donc dans le cas du paragraphe II.2.1 où $f_{pA} \sim 1\text{kHz} \gg \nu_m = 40\text{Hz}$. Le potentiel à la pointe de la pipette est proportionnel à la dérivée du signal de potentiel et est donné par l'équation (11) : $V = dU/dt R_s c$.

A.N. : $V = 100 \cdot 10^{-3} / 10^{-3} \times 10^9 \cdot 10^{-14} = 1\text{mV}$. On mesure $I_p = V / R_p = 10^{-3} / 5 \cdot 10^6 = \underline{200\text{pA}}$

II.1.3.2. Pour un EPSP autaptique dans une cellule mature

Nous allons voir que l'EPSP autaptique a des constantes de temps caractéristiques plus faible ou du même ordre de grandeur que le temps caractéristique de la membrane. La

situation décrite dans le paragraphe II.1.2.1. n'est donc plus valide comme dans le cas du potentiel d'action et nous devons considérer le cas du II.1.2.2.

Dans une cellule mature, le potentiel de membrane atteint le potentiel de réversion des ions Na^+ proche de 0mV. Si on considère que le potentiel de repos est environ de -60mV , le potentiel U augmente d'environ 60mV . Le potentiel V est donné par l'équation (12) :

$$V \sim \frac{R_s}{r} U$$

A.N. : $V = 2,5 \cdot 10^{-3} \cdot 60 \cdot 10^{-3} = 150 \mu\text{V}$. Et on mesure $I_p = V / R_p = 15 \cdot 10^{-5} / 5 \cdot 10^{+6} = \underline{30\text{pA}}$

Ainsi pour une autapse mature, le signal du potentiel d'action devrait être environ entre 6 à 7 fois le signal observé pour l'eps autaptique.

II.1.4. Comparaison avec les mesures expérimentales

Le signal pour le potentiel d'action varie en général entre 100pA et 300pA . A partir de 17 jours in vitro, nous avons pu observer un signal pour l'autapse excitatrice dont l'amplitude varie entre 10 et 50pA .

Les signaux que nous mesurons expérimentalement pour un potentiel d'action ou pour l'autapse sont donc du même ordre de grandeur que ce qui est attendu en théorie. Le rapport entre l'amplitude des signaux pour l'EPSP autaptique et le potentiel d'action est compris entre 0.06 et 0.3 (Figure II-2C) ce qui est une fourchette raisonnable compte tenu de l'estimation donnée ci-dessus ($30\text{pA}/200\text{pA}=0.15$).

II.1.5. Seuil minimal de détection de l'autapse

Le bruit électrique dans les enregistrements en configuration cellule attachée peut atteindre jusqu'à 5pA (pic à pic). Puisque pour des fréquences inférieure à 40Hz , le signal que l'on mesure est directement proportionnel au potentiel intracellulaire, le potentiel U minimum est donc donné par le calcul suivant :

$$V = R_p I_p = 5 \cdot 10^{-12} \times 5 \cdot 10^{+6} = 25 \cdot 10^{-6} \text{V}$$

$$U = \frac{r}{R_s} V = \frac{r}{R_s} V = \frac{25 \cdot 10^{-6}}{2,5 \cdot 10^{-3}} = 10^{-2} = 10 \text{ mV}$$

La dépolarisation minimale de l'EPSP autaptique que nous pouvons mesurer est donc de l'ordre de la dizaine de millivolts.

II.1.6. Avantages et limites de la technique

Nous avons vu que la configuration cellule attachée permet d'estimer le temps d'apparition des potentiels d'action et même d'avoir une idée globale de l'amplitude et de la cinétique de l'EPSP autaptique lorsque son amplitude est supérieure au bruit électrique.

Une limite importante de la technique réside dans le fait que pour des signaux dans la fréquence du kHz, tels que des potentiels d'action, notre mesure est proportionnelle à la dérivée du signal de potentiel et pas au potentiel directement. Le calcul que nous avons réalisé pour un potentiel d'action au repos montre que le signal associé au potentiel d'action est alors très net. En revanche, considérons le cas où un potentiel d'action arrive sur l'EPSP autaptique d'une cellule mature qui atteint en général à son pic 0mV. Si tous les canaux sodiques sont recrutés pour faire un potentiel d'action, le potentiel de membrane atteint la valeur E_{Na} environ égale à 50mV. La dérivée du potentiel intracellulaire n'est plus égale alors qu'à 50mV/1ms, soit la moitié du signal que nous mesurons pour le premier potentiel d'action. Si en outre, une partie des canaux sodiques sont inactivés par la dépolarisation de l'epsp autaptique, le potentiel n'atteint plus E_{Na} et le signal lié à un potentiel d'action sur l'autapse sera encore plus faible. La présence d'un potentiel d'action sur l'EPSP de l'autapse peut donc être ambiguë à partir seulement des enregistrements en configuration cellule attachée (Fig. II-2D). C'est à cause de cette ambiguïté que nous écarterons tous les intervalles de temps entre potentiels d'action (ISIs, Inter Spike Intervals) inférieurs à 20ms dans notre étude.

II.2. Estimation des potentiels d'action et mesure des variations de concentration du calcium intra-cellulaire par imagerie de fluorescence avec la sonde Fura 2 AM

Le calcium est un ion bivalent présent à une concentration d'environ $[Ca]_e = 1,5mM$ dans le milieu extracellulaire (Sanchez-Vives and McCormick, 2000) et largement extrudé du cytosol par des pompes et transporteurs vers le milieu extérieur et les organelles intracellulaires telles que le réticulum. Au repos la concentration intracellulaire $[Ca]_i$ du calcium cytoplasmique $[Ca]_{repos}$ est de l'ordre de 100nM et la différence de concentration entre milieu extra- et intra- cellulaire est à l'origine d'un potentiel de réversion pour le calcium supérieur à 100mV.

Dans nos conditions expérimentales, à 20°C et pour une concentration $[Ca]_e = 3\text{mM}$, le potentiel de réversion du calcium est environ égal à :

$$E_{Ca} = RT/zF \log [Ca]_e / [Ca]_i = 29 \text{ mV} \times \log (3 \cdot 10^{-3} / 10^{-7}) \sim 130\text{mV}$$

Lors d'un potentiel d'action, la membrane plasmique se dépolarise entraînant l'ouverture de canaux calciques dépendant du potentiel, haut et bas seuils (Chin, 1998; Weiss and Burgoyne, 2002) qui laissent passer le calcium selon son gradient électrochimique : dans le sens entrant dans les conditions physiologiques. L'estimation des potentiels d'action par imagerie calcique demande de détecter ces augmentations transitoires de la concentration de calcium intracellulaire. Nous disposons aujourd'hui de nombreuses sondes dont l'intensité de l'émission de fluorescence dépend de la concentration en calcium. L'affinité K_d et la cinétique d'association et de dissociation (k_{on} , k_{off}) de la sonde au calcium, la variation de fluorescence pour une variation donnée de la concentration en calcium, la dynamique (variation maximum de concentration de calcium mesurable), la sensibilité au photoblanchiment (qui se traduit par le coefficient d'extinction) sont des paramètres critiques pour le choix de la sonde.

La réaction de liaison d'une sonde X au calcium est la suivante :



A l'équilibre, la constante de dissociation est définie par :

$$K_d = [X] \cdot [Ca] / [XCa] \quad (2)$$

où $[X]$ et $[Ca]$ sont les concentrations libres en sonde et en calcium et $[XCa]$ est la concentration du complexe.

II.2.1. Les propriétés des sondes

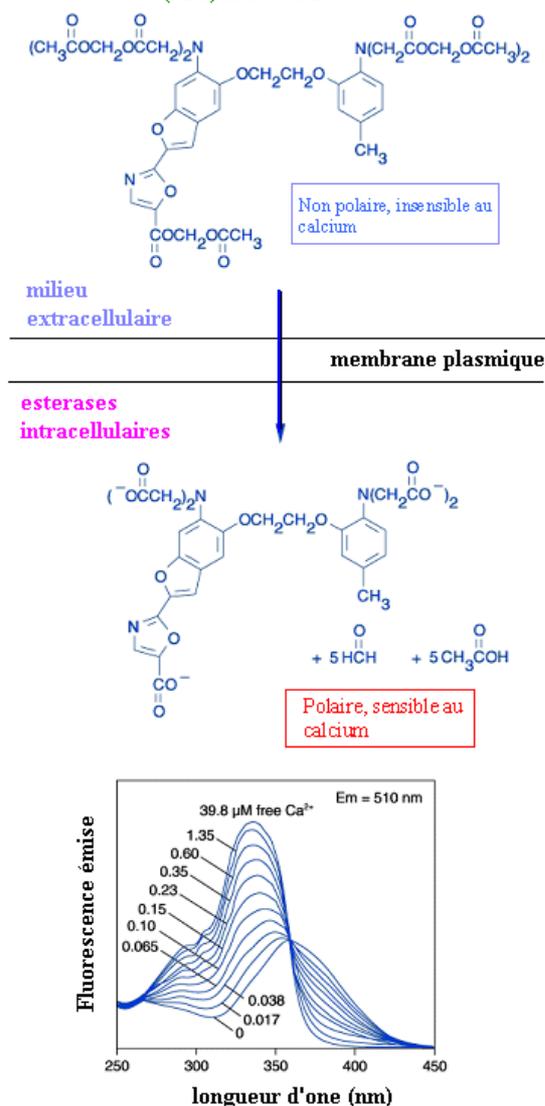
II.2.1.1. Affinité et caractéristiques spectrales de la sonde

Pour mesurer une variation du signal d'intensité d'émission de fluorescence suffisante (supérieure au bruit) lors d'un transitoire calcique, l'affinité de la sonde doit être compatible avec les variations de concentration de calcium étudiées. En effet, pour une sonde ayant une constante de dissociation K_d donnée, on estime que les concentrations en calcium intracellulaire mesurables sont comprises entre 0,1 et 10 fois la valeur de K_d . Pour observer les entrées de calcium consécutives à un potentiel d'action, il est préférable de choisir une sonde avec une bonne dynamique, un faible coefficient d'extinction, et une constante d'affinité de l'ordre de la concentration en calcium basal ($K_d \sim 100\text{-}200\text{nM}$, haute affinité).

II.2.1.2. Chargement du cytosol des cellules en sonde fluorescente

Une méthode consiste en l'injection de la sonde avec une pipette de patch clamp. Après dialyse (~10 minutes), la sonde se répartit de façon homogène dans la cellule à la concentration imposée dans la pipette. Cette approche permet le contrôle de la concentration en sonde, mais pas le marquage de plusieurs cellules simultanément. Une méthode alternative pour marquer plusieurs cellules simultanément consiste à faire incuber les cellules avec des dérivés des sondes où les groupes carboxyl sont estérifiés. Ces formes dites acétoxy-méthyl (AM) des sondes ne sont pas polaires et peuvent ainsi pénétrer dans les cellules à travers la membrane plasmique. Sous leur forme AM, elles ne sont pas sensibles au calcium, mais, une fois dans le cytosol, leurs deux groupes esters sont clivés par des estérases cellulaires ce qui a pour conséquence de les rendre sensibles au calcium et de les piéger dans le cytosol (voir Fig. II-3).

CHARGEMENT DES NEURONES AVEC LE DERIVE ACETOXYMETHYL ESTER (AM) DU FURA 2



Fura-2
 $K_d \sim 135 \text{ nM} - \text{Mg}^{2+}$
 $K_d \sim 224 \text{ nM} + \text{Mg}^{2+}$

Figure II-3. Sonde fluorescente Fura 2 AM sensible à la concentration en calcium. Structure moléculaire ; internalisation et estérification dans la cellule ; spectre d'absorption en fonction de la concentration en calcium.

II.2.1.3. Calibration

Il serait extrêmement intéressant de pouvoir faire une mesure optique calibrée de la concentration de calcium et de ses variations à partir de la mesure du signal de fluorescence. Néanmoins, la détermination optique de la concentration en calcium nécessite de connaître plusieurs paramètres dont la mesure est difficile, tels que l'efficacité d'excitation et de détection de la fluorescence sur le montage. En outre, dans le cas du chargement par les sondes AM, la concentration effective en sondes dans le cytosol est inconnue.

II.2.1.4. Perturbation de l'homéostasie calcique

La sonde faisant office de tampon calcique hautement concentré dans la cellule, elle peut modifier lors d'une entrée de calcium la dynamique cellulaire ainsi que l'activité d'enzymes ou de canaux (par exemple le phénomène de Calcium Induced Calcium Release CICR qui peut être perturbé par le Fura 2, (Alonso et al., 2003)).

Conclusion

Considérant ces contraintes, j'ai choisi de marquer les cellules et de visualiser les variations de la concentration de calcium intracellulaire avec le Fura 2 AM. Le Fura 2 est un indicateur calcique de haute affinité excité dans l'UV (Fig. II-3). Dérivé de l'EGTA, il lie l'ion calcium Ca^{++} via 2 groupes carboxyles avec une constante de dissociation comprise entre $0,14\mu\text{M}$ et $0,22\mu\text{M}$ selon la concentration en magnésium, le pH et la viscosité du milieu.

Dans le cas du Fura 2, noté ci-dessous F, la réaction de liaison au calcium libre dans le cytosol est (cf. Eq. 1):



A l'équilibre, on définit la constante de dissociation comme :

$$K_d = [\text{F}] \times [\text{Ca}] / [\text{FCa}] \quad (2')$$

En liant un ion calcium, le maximum d'excitation du Fura 2 se décale vers le bleu (voir spectre d'excitation, Fig. II-3). Le pic d'excitation est à 363nm sans calcium et à 335nm dans des conditions de saturation tandis que le maximum d'émission reste autour de 510nm. Pour mesurer la concentration absolue en calcium, on peut exciter la sonde à deux longueurs d'onde (typiquement 340nm et 380nm) et le ratio de la fluorescence émise pour ces deux longueurs d'onde renseigne sur la concentration du complexe [FCa] (Grynkiewicz et al., 1985) et donc sur la concentration en calcium libre $[\text{Ca}] = K_d \times [\text{FCa}] / ([\text{F}]_T - [\text{FCa}])$. $[\text{F}]_T$ est la concentration totale en sonde et est déterminé par une expérience où la sonde est introduite dans la cellule par une pipette de patch.

Une fois clivée, la sonde Fura 2 AM a les mêmes caractéristiques que le Fura 2 mais le mode de chargement en sonde introduit plusieurs biais :

1) la concentration totale en sonde $[F]_T$ dans le cytoplasme n'est pas connue car elle dépend du temps d'incubation, de la concentration en sonde Fura 2 AM dans le bain, mais aussi de l'activité des estérases intracellulaires. Cette incertitude rend difficile la calibration du signal et l'estimation quantitative de la concentration en calcium libre (voir ci dessous).

2) la sonde peut être clivée par les estérases endogènes après avoir atteint les compartiments intracellulaires tels que la mitochondrie ou le réticulum et ainsi être compartimentalisée dans ces organelles riches en calcium constituant alors une source de bruit parasite.

3) l'hydrolyse des formes esters peut être incomplète conduisant à des formes fluorescentes non sensibles au calcium.

II.2.2. De la mesure d'intensité de fluorescence dans le corps cellulaire à la concentration en calcium libre.

II.2.2.1. L'intensité du signal de fluorescence renseigne sur la quantité de calcium liée à la sonde

L'intensité de fluorescence totale I au niveau du corps cellulaire est la somme du signal émanant des formes moléculaires libres et liées de la sonde :

$$I = S_F n_F + S_{FCa} n_{FCa} \quad (4)$$

où n_{FCa} et n_F sont les quantités de sonde sous les formes FCa et F respectivement et S_{FCa} et S_F les coefficients de proportionnalité qui décrivent les propriétés de fluorescence respectivement des formes de la sonde liée au calcium et libre. n_{FCa} et n_F sont donnés par la loi d'action de masse :

$$n_{FCa} = n_T [Ca] / (K_d + [Ca]) \text{ et } n_F = n_T K_d / (K_d + [Ca])$$

où n_T est la quantité totale de sonde.

Dans une cellule dont le volume V_c est confiné, un influx de calcium $\Delta n_{Ca,entrant}$ se lie entièrement à la sonde en excès et l'application de la loi de conservation de la quantité totale de sonde nous impose que :

$$\Delta n_{Ca,entrant} = \Delta n_{FCa} = - \Delta n_F \text{ et } \Delta I = \Delta n_{FCa} (S_{FCa} - S_F) \quad (5)$$

ΔI est la variation de fluorescence due à l'influx de calcium $\Delta n_{Ca,entrant}$. Les constantes de proportionnalité S_x dépendent de l'intensité d'illumination, de l'efficacité de détection et des

propriétés de la sonde mais pas de la concentration en sonde. Si ces paramètres sont connus pour un montage, la mesure de fluorescence est une estimation directe de la quantité de calcium qui lie le Fura 2.

II.2.2.2. Mesure des flux entrant de calcium

Cependant, pour mesurer les flux de calcium entrant dans la cellule de façon quantitative, d'autres processus doivent être considérés. Le calcium ($\Delta n_{Ca,entrant}$) qui rentre dans la cellule lors d'une brève dépolarisation va apparaître seulement partiellement comme du calcium libre ($\Delta n_{Ca,libre}$). Dans les quelques millisecondes qui suivent le pulse (imposé par le potentiel d'action ou la pipette), le calcium lie le Fura 2 (Δn_{FCa}) ainsi que les tampons endogènes (Δn_{SCa}) et est évacué par les pompes (Δn_p) vers l'extérieur ou les organelles. La quantité de calcium injectée dans la cellule se répartit donc de la manière suivante :

$$\Delta n_{Ca,entrant} = \Delta n_{Ca,libre} + \Delta n_{FCa} + \Delta n_{SCa} + \Delta n_p \quad (6)$$

Sur une échelle de temps courte (de l'ordre de la dizaine de ms), on peut supposer que le terme de pompe est négligeable. Donc :

$$\Delta n_{Ca,entrant} = \Delta n_{Ca,libre} + \Delta n_{FCa} + \Delta n_{SCa} \quad (7)$$

Pour décrire l'efficacité de liaison d'une sonde au calcium dans une situation donnée, on peut définir une constante de liaison de la sonde pour le calcium par :

$$\kappa_F = d[FCa]/d[Ca] \quad (8)$$

en utilisant la définition du K_d et la loi de la conservation de la sonde, on a :

$$\begin{aligned} [FCa] &= [F]_T[Ca] / (K_d + [Ca]) \\ \text{et } \kappa_F &= K_d [F]_T / (K_d + [Ca])^2 \end{aligned} \quad (8')$$

On voit que κ_F est maximal et égal à $\kappa_F = [F]_T / K_d$ pour des petites concentrations en calcium. La constante de liaison du calcium endogène sera définie de manière similaire par :

$$\kappa_S = d[SCa]/d[Ca] \quad (9)$$

Ainsi,

$$\Delta n_{Ca,entrant} = V_c \times \Delta[Ca] (1 + \kappa_S + \kappa_F) \quad (10)$$

où V_c est le volume du cytosol de la cellule accessible au calcium et $\Delta[Ca]$ est la variation de la concentration en calcium libre dans la cellule.

Le changement de fluorescence ΔI associé à l'injection de la quantité $\Delta n_{Ca,entrant}$ de calcium en utilisant les équations (5), (8) et (10) est alors :

$$\Delta I = \Delta n_{Ca,entrant} (S_{CaF} - S_F) \kappa_F / (1 + \kappa_S + \kappa_F) \quad (11)$$

La variation de fluorescence est donc une fonction complexe de la concentration de calcium via la dépendance de κ_F et κ_S en fonction de $[Ca]$ (Eq. (8')). Néanmoins, à haute

concentration en indicateurs fluorescents, le changement de fluorescence est directement proportionnel à la quantité de calcium entrant dans la cellule, car les sondes fluorescentes dominent les autres tampons. Dans ce cas, la mesure de fluorescence permet à nouveau une mesure quantitative des variations de la concentration de calcium, si S_{CaF} et S_F sont connus.

II.2.2.3. Equation décrivant un transitoire de calcium suite à un potentiel d'action.

Lors d'un pulse de calcium lié à un potentiel d'action à l'instant τ_p , la variation de la concentration totale en calcium $[Ca]_T$ est la somme des flux entrant et sortant soit :

$$d[Ca]_T / dt = j_{in} + j_{out} \quad (12)$$

En écrivant l'Eq.(12) en fonction de la concentration en calcium libre $[Ca]$ grâce à l'Eq. (10), on obtient :

$$(1 + \kappa_S + \kappa_F) d[Ca] / dt = \Delta[Ca]_T \delta(t - \tau_p) - \gamma ([Ca] - [Ca]_{repos}) \quad (13)$$

où $\Delta[Ca]_T$ est la quantité totale de calcium rentrant par les canaux voltage-dépendant lors du pulse, γ le taux d'extrusion du calcium par les pompes et transporteurs et $[Ca]_{repos}$ la concentration en calcium libre au repos.

Cette équation correspond donc à un transitoire calcique décroissant de façon exponentielle. Il a une valeur A à l'origine, proportionnelle à la quantité de calcium injectée lors d'un pulse, et inversement proportionnelle à la somme des constantes de liaison des tampons en présence. Puis la concentration en calcium décroît en suivant une loi exponentielle caractérisée par un temps de décroissance τ :

$$A = \Delta[Ca_T] / (1 + \kappa_S + \kappa_F) = (Q_{Ca} / 2FV_c) / (1 + \kappa_S + \kappa_F) \quad (14)$$

$$\tau = (1 + \kappa_S + \kappa_F) / \gamma \quad (15)$$

II.2.2.4. Effets de l'application d'une sonde de constante de liaison $\kappa_F = [F]_T / K_d$

Effets généraux de l'application de la sonde

L'addition d'une sonde sensible au calcium dans la cellule a donc comme effet de diminuer l'amplitude du transitoire calcique et de rallonger sa durée. Ces effets seront d'autant plus prononcés que la sonde est en grande concentration ou a une forte affinité (faible K_d) pour le calcium. On peut noter par contre que l'intégrale de ce transitoire $A\tau = \Delta[Ca_T] / \gamma$ ne dépend pas de la sonde mais seulement de la quantité totale de calcium entrant et du taux d'extrusion.

Estimation de $\kappa_F = [F]_T / K_d$

Comme nous l'avons dit, la concentration en sonde n'est pas connue lorsqu'on procède au chargement des formes AM. Cependant nous avons pu estimer la concentration en Fura 2 en comparant les variations d'intensité de fluorescence mesurées avec les sondes AM à celles obtenues après injection de la sonde hydrophile à des concentrations connues (10, 50, 100 μM) dans la pipette de patch.

Dans les expériences utilisant le Fura 2 AM couplées au patch clamp, pour un potentiel d'action unique, nous observons une variation de fluorescence transitoire caractérisée par une amplitude initiale $\Delta I / I = (I - I_0) / (I_0 - B)$ (où B est le bruit et I_0 la fluorescence initiale) comprise entre 2 et 4 % et un temps de décroissance entre 2,5 à 3s.

Nous avons observé les résultats suivants en injectant le Fura 2 via la pipette :

Sonde utilisée	τ (ms)	κ_F
Fura 2 AM (1 μM 15 min)	2730 +/- 512 (n=14)	~ 330
Fura 2, 10 μM	1120 +/- 227 (n=3)	50
Fura 2, 50 μM	2880 +/- 309 (n=3)	250
Fura 2, 100 μM	4990 +/- 463 (n=4)	500

Nous en concluons que, dans nos conditions expérimentales, le Fura 2 après clivage des groupes ester est présent dans le cytoplasme à une concentration avoisinant 50 μM .

Estimation de κ_S et de γ

Par ailleurs, les mesures avec le Fura 2 dans la pipette de patch permettent d'estimer les constantes κ_S et γ dans les neurones de l'hippocampe en culture. La représentation de τ en fonction de κ_F est une droite de pente $1 / \gamma$ et de valeur à l'origine $(1 + \kappa_S) / \gamma$ (Fig. II-4). On estime ainsi que $\kappa_S \sim 69$ et $\gamma \sim 116/\text{s}$ ce qui est proche des valeurs mesurées pour des neurones hippocampiques glutamatergiques en culture (Lee et al., 2000). Le temps de décroissance réel (sans sonde exogène) peut donc être estimé à environ 600ms dans le corps cellulaire des neurones hippocampiques en culture.

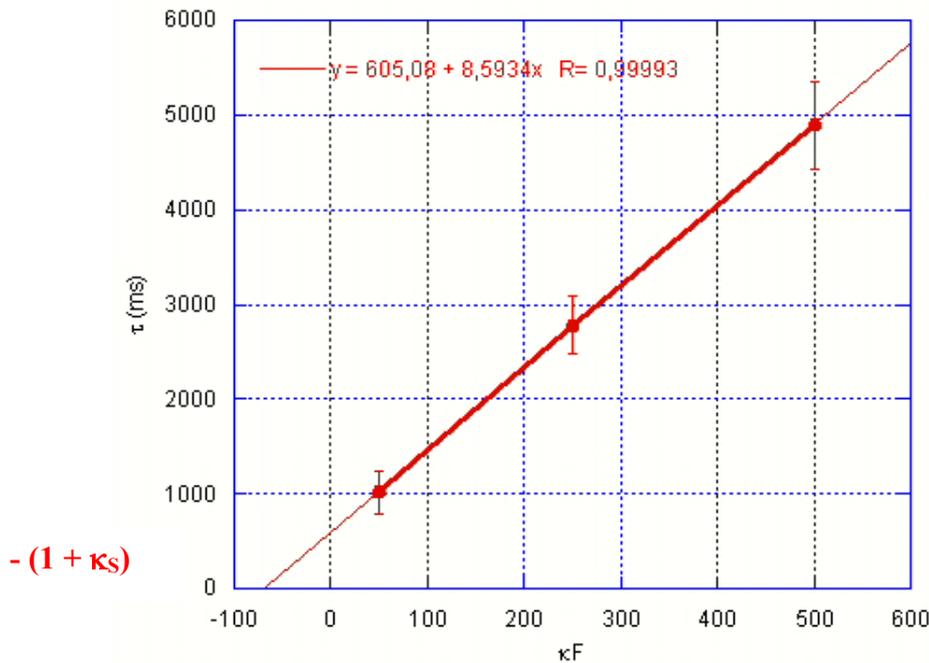


Figure II-4. Détermination de κ_S . Les mesures de variation de fluorescence lors d'un potentiel d'action avec le Fura 2 dans la pipette de patch permettent d'estimer les constantes κ_S et γ dans les neurones de l'hippocampe en culture. Le temps de décroissance du transitoire calcique consécutif au potentiel d'action est $\tau = (1 + \kappa_S + \kappa_F) / \gamma$. La représentation de τ en fonction de κ_F est donc une droite de pente $1 / \gamma$ et de valeur à l'origine $(1 + \kappa_S) / \gamma$. On estime ainsi que $\kappa_S \sim 69$ et $\gamma \sim 116/s$. Le temps de décroissance réel (sans sonde exogène) peut donc être estimé à environ 600ms dans le corps cellulaire des neurones hippocampiques en culture.

II.2.2.5. Estimation de l'amplitude A de la variation de concentration du calcium libre lors d'un transitoire calcique

Comme nous l'avons vu ci-dessus, pour obtenir une mesure quantitative de la concentration en calcium libre et de ses variations, il est nécessaire de connaître les paramètres S_{CaF} et S_F . Il existe différentes méthodes permettant de s'affranchir de la connaissance de ces paramètres. La plus ancienne consiste à déterminer la concentration absolue en calcium libre par une mesure ratiométrique avec des sondes excitables à deux longueurs d'onde. Nous n'avons pas utilisé de mesures à 340 et 380nm du Fura 2, en particulier parce que cette méthode est difficile à mettre en œuvre dans le cas d'enregistrements à cadence élevée. Plus récemment, il a été démontré qu'il était possible de mesurer la concentration en calcium via des mesures à une seule longueur d'onde d'excitation, à condition d'utiliser des sondes qui disposent d'une grande dynamique et dans des conditions proches de la saturation (Maravall et al., 2000). Le Fura 2 n'a malheureusement pas une très grande gamme dynamique ($[I_{max} - I_{min}] / I_{min} = 1,5-1,6$).

Cependant il est possible d'estimer dans nos expériences la variation de $[Ca]$ en fonction de la concentration de repos.

D'après la définition du K_d , on a :

$$[Ca] = K_d [FCa] / [F]$$

En utilisant l'Eq. (4) sous la forme $I = S_F n_F + S_{FCa} n_{FCa} = S_F n_T + (S_{FCa} - S_F)n_{FCa}$ ainsi que les expressions respectives des intensités pour des concentrations maximum et minimum en calcium, $I_{min} = S_F n_T$ et $I_{max} = S_{FCa} n_T$, on peut réécrire cette expression sous la forme suivante :

$$[Ca] = K_d (I - I_{min}) / (I_{max} - I)$$

Regehr et Atluri ont montré que l'amplitude A du calcium libre (voir Eq. (14)) pouvait être estimée à partir du degré de saturation d'un indicateur à haute affinité (Regehr and Atluri, 1995; Sabatini and Regehr, 1995; Feller et al., 1996a). La figure II-5 montre le changement de fluorescence d'un indicateur évoqué par deux injections brèves de calcium. La seconde injection évoque un changement de fluorescence plus petit que la première du fait de la saturation partielle de la sonde.

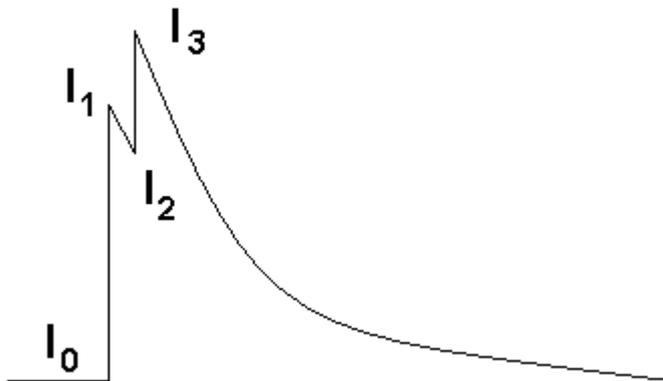


Figure II-5. Estimation de la variation de concentration en calcium lors d'un transitoire calcique à partir de la sommation de deux potentiels d'action successifs très proches. Pour deux potentiels d'actions successifs et très proches dans le temps, les 2 signaux transitoires de fluorescence ont des amplitudes différentes à cause de la saturation de la sonde. On peut montrer (voir texte) que la variation de fluorescence $\Delta[Ca]$ lors d'un transitoire calcique du à un potentiel d'action peut être déduite d'une telle expérience. On a en effet : $\Delta[Ca] = ([Ca]_{repos} + K_d) (1 - \alpha) / 2\alpha$, où $\alpha = (I_3 - I_2) / (I_1 - I_0)$ et en supposant que $I_2 \sim I_1$. Cette méthode permet d'estimer la variation de concentration en calcium si $[Ca]_{repos}$ et K_d sont connues.

En supposant que la concentration en calcium est la même dans les deux cas, son amplitude peut être estimée à partir du ratio α des deux changements de fluorescence :

$$\Delta[Ca] = ([Ca]_{repos} + K_d) (1 - \alpha) / 2\alpha \quad (16)$$

où $\alpha = (I_3 - I_2) / (I_1 - I_0)$ et en supposant que $I_2 \sim I_1$ (Feller et al., 1996a). Cette méthode donne une bonne estimation de la variation de concentration en calcium mais suppose que les valeurs de $[Ca]_{repos}$ et de K_d sont connues et valides.

Prenons un exemple typique où la mesure de fluorescence est couplée à l'enregistrement en configuration cellule attachée. Sur la figure II-6A, 3 potentiels d'action isolés se suivent à

une fréquence d'environ 0,25Hz suffisamment faible pour qu'il n'y ait pas sommation des variations de concentration du calcium intracellulaire. L'amplitude du $\Delta I/I$ associée à chaque transitoire est de 5%. Dans le cas représenté dans la figure II-6B, 4 potentiels d'action se succèdent en moins de 1,5s. La sommation des transitoires calciques permet d'estimer α et donc l'augmentation relative de concentration de calcium. On peut déterminer à partir de l'enregistrement représenté sur la figure que $\alpha = 0.69$. Si la concentration de calcium libre au repos est négligeable (en présence d'un excès de Fura 2), pour chaque potentiel d'action la concentration en calcium libre atteint 32nM. On peut d'autre part estimer que dans des conditions physiologiques (sans Fura 2 AM ajouté), avec une concentration de base de 100nM, la concentration en calcium libre atteindrait 250nM lors d'un potentiel d'action isolé.

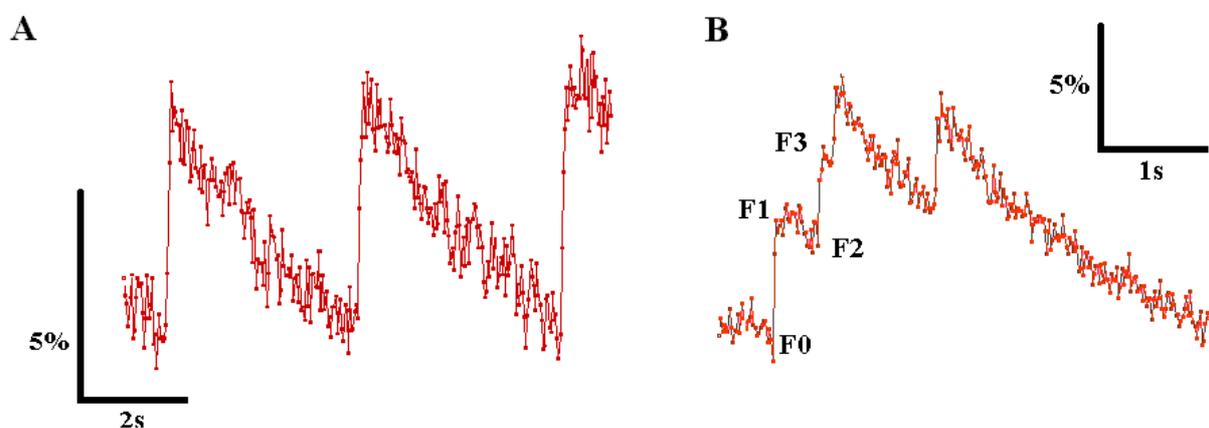


Figure II-6. Mesure des variations de $\Delta F / F$ Fura 2 AM pour plusieurs potentiels d'action successifs. **A.** 3 potentiels d'action se suivent séparés par des intervalles (3-4s) trop grands pour qu'il y ait sommation des transitoires calciques associés à chacun. **B.** Les 4 potentiels d'action arrivent en 1,5s entraînant la sommation des transitoires calciques. Dans ce cas, la mesure des fluorescences F_0 , F_1 , F_2 et F_3 permet d'estimer la variation en calcium libre par potentiel d'action (voir texte et Fig. 5). Pour s'assurer de la singularité de chaque potentiel d'action, la cellule est enregistrée simultanément en configuration cellule attachée.

Cet exemple montre d'une part que l'on peut estimer les flux de calcium lors de chaque potentiel d'action et que d'autre part, l'utilisation de sondes fluorescentes à haute concentration à un effet tampon considérable qui réduit les augmentations de concentration du calcium libre effectives lors des bouffées d'activité.

II.2.2.6. Sommation de transitoires successifs lors d'une bouffée de potentiels d'action.

Si plusieurs influx de calcium arrivent dans une gamme de temps courte par rapport au temps de décroissance du calcium intracellulaire, l'amplitude du transitoire calcium augmente avec la charge de calcium totale injectée dans la cellule. Considérons un train de potentiels d'action évoqués qui débutent à temps 0 et sont séparés de $\Delta t = 1 / \phi_p$. Le niveau de calcium

au dessus de la concentration au repos immédiatement avant la (n+1) ème stimulation est donné par la progression géométrique suivante (Regehr and Atluri, 1995) :

$$\Delta[\text{Ca}] (n\Delta t) = A \sum e^{-i\Delta t/\tau} = A (1 - e^{-n\Delta t/\tau}) / (e^{-\Delta t/\tau} - 1)$$

Pour une stimulation à basse fréquence ($\phi_p < 2 \tau$), il y a peu de sommation mais pour des fréquences plus élevées les transitoires se somment et atteignent une valeur plateau P d'équilibre dans lequel influx et extrusion se compensent, de telle sorte que la concentration en calcium libre [Ca] varie autour d'une valeur d'équilibre. La constante de temps de la montée et de la descente qui suit la fin de la stimulation sont chacune données par τ . Le plateau atteint est proportionnel à la fréquence des stimulations et à l'intégrale $A\tau$ constante indépendante du tamponnage du calcium par la sonde (Tank et al., 1995; Helmchen et al., 1997):

$$P = A \tau \phi_p = Q_{\text{Ca}} \phi_p / 2FV_c \gamma$$

Ainsi la valeur du plateau d'équilibre atteinte dans une bouffée de potentiels d'action n'est pas affectée par la capacité de liaison de la sonde. L'action de la sonde se limite juste à la dynamique transitoire du calcium mais ne perturbe pas son état d'équilibre. Les effets de modifications de la quantité de calcium entrant, de la capacité de liaison, de la constante d'extrusion affectent la forme globale de la bouffée transitoire calcique (voir Fig. II-6).

II.2.2.7. Estimation du timing des potentiels d'action

L'imagerie du calcium intracellulaire avec des sondes telles que le Fura 2 AM permet d'évaluer le timing des potentiels d'action simultanément et dans *tous* les corps cellulaires des neurones d'un réseau avec une résolution temporelle de 50ms. Le programme « d'extraction » des potentiels d'action a été établi sous Fortran 77 par Simona Cocco ; il repose sur le seuillage de la dérivée du signal de fluorescence (Fig. II-7 et II-8). Les variations de fluorescence ne sont pas en réalité linéaires lors d'une bouffée de potentiels d'action : l'amplitude du transitoire de calcium diminue pour chaque potentiel d'action successif jusqu'à la saturation totale de la sonde. Le seuil de détection diminue lors de potentiels d'action successifs de manière à rendre compte de cette non linéarité.

Le calcul de la dérivée moyennée permet de déterminer dans quel état le neurone se trouve (silence pré bouffée-dérivée nulle, bouffée-dérivée négative, post bouffée-dérivée positive). Le seuil de détection des potentiels d'action est ajusté en fonction de l'état dans lequel le neurone se trouve. Le seuil est élevé dans une période de silence et diminue dans une bouffée. Les seuils dans chaque état sont ajustés à la main pour optimiser la détection de chaque potentiel d'action sans ajouter des potentiels d'action surnuméraires. Notre approche a

été validée par une mesure simultanée des potentiels d'action en patch clamp et en imagerie calcique (Fig. II-8).

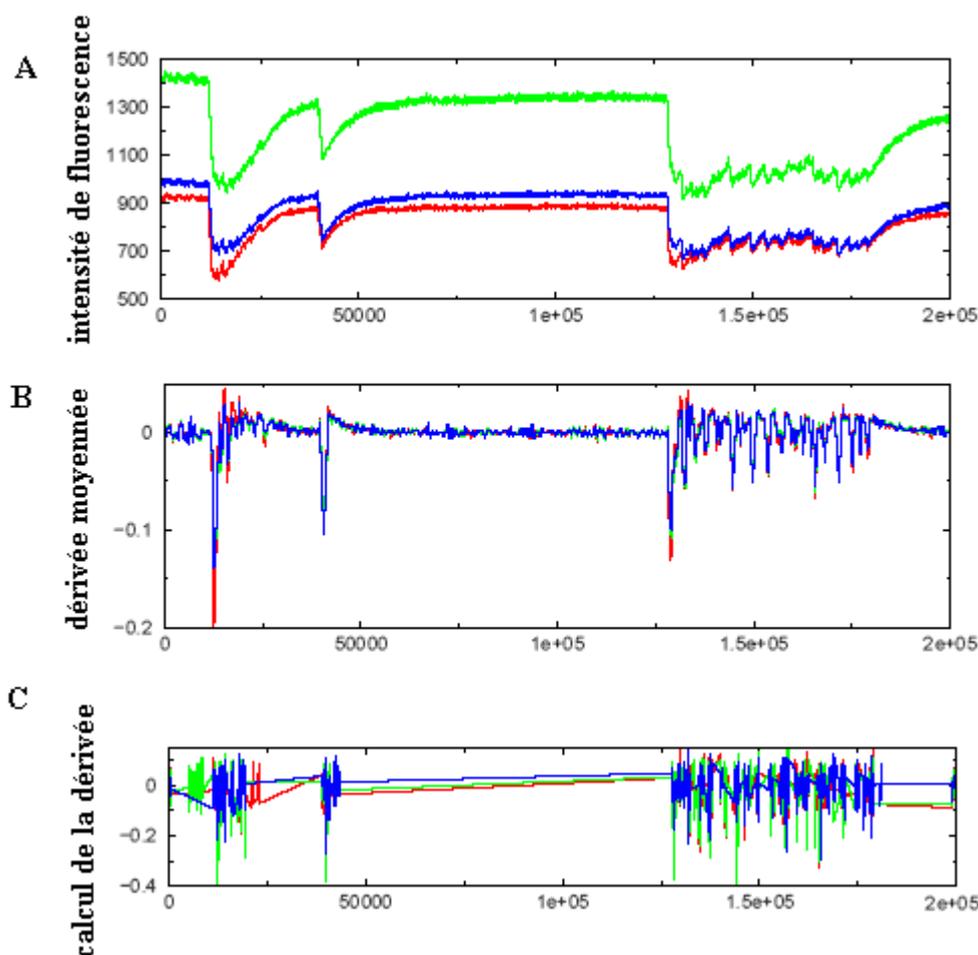


Figure II-7. Principe de détection des potentiels d'action par le seuillage de la dérivée du signal de fluorescence émise par le Fura-2. **A.** Intensité de fluorescence mesurée au niveau du corps cellulaire de trois neurones d'un réseau. **B.** Calcul de la dérivée moyennée. **C.** Calcul de la dérivée du signal de fluorescence seuillé. Le temps représenté en abscisse est indiqué en secondes, l'intensité de fluorescence en unités arbitraires.

En couplant les enregistrements électrophysiologiques à la mesure d'émission de fluorescence du Fura 2, nous avons pu estimer que l'efficacité de détection des potentiels d'action dans des conditions non saturantes de la sonde était d'environ 95%. Nous avons éliminé pour l'analyse par ailleurs les enregistrements où, dans une bouffée de potentiels d'action, la sonde saturait ou bien où des cellules gliales sous les neurones présentaient des oscillations calciques lentes et parasites.

Conclusion

L'intérêt majeur de la technique d'imagerie calcique de l'activité électrique des neurones est de permettre d'enregistrer l'activité d'un grand nombre de cellules

simultanément et donc d'accéder aux corrélations d'activité dans un réseau de neurones en culture. Cette technique a également été utilisée en tranches dans le même but (Mao et al., 2001; Cossart et al., 2003). On peut se demander néanmoins dans quelle mesure l'utilisation d'une sonde à haute affinité liant le calcium ne perturbe pas l'homéostasie calcique et ainsi n'influe pas sur l'activité spontanée des cellules ? En effet, les entrées de calcium sont perturbées par l'addition de la sonde Fura 2 qui entraîne à la fois une diminution du pic de la concentration en calcium libre atteinte lors du transitoire calcique et ralentit d'un facteur 5 la cinétique de retour vers une valeur de base. Néanmoins, nous verrons (cf. chapitres III, IV et V) dans les exemples bien caractérisés des autapses excitatrices et inhibitrices, que la dynamique de l'activité spontanée mesurée par les enregistrements en cellule attachée et en imagerie calcique ont les mêmes caractéristiques (i.e. les mêmes distributions d'intervalles de temps entre potentiels d'action). Nous avons donc l'espoir de ne pas trop altérer la physiologie des neurones qui sous tend l'activité spontanée.

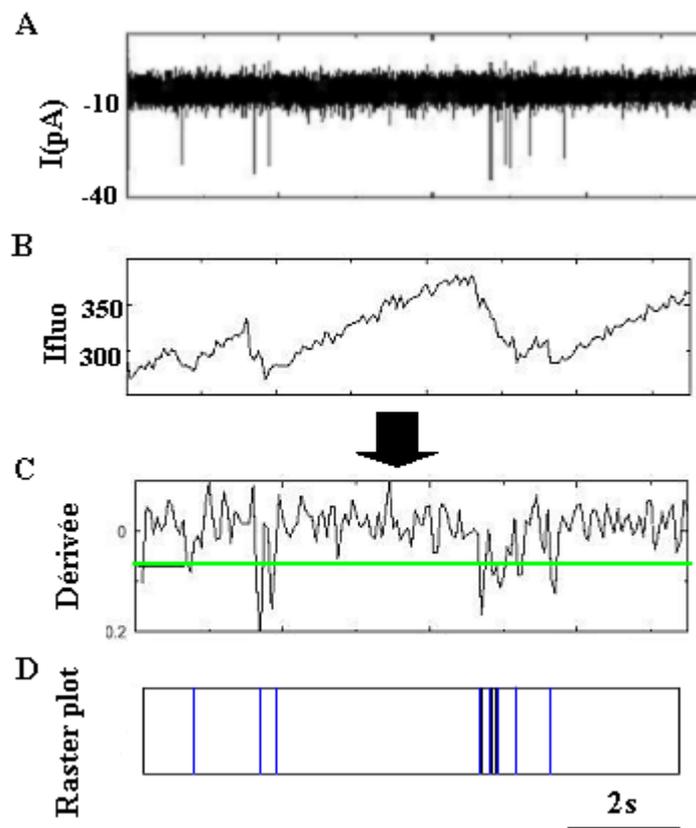


Figure II-8. La comparaison de la détection des potentiels d'action par le seuillage de la dérivée du signal de fluorescence à l'enregistrement simultané de patch clamp en configuration cellule attachée montre une bonne estimation des potentiels d'action à partir du signal de fluorescence. **A.** Enregistrement d'une cellule chargée par le Fura 2 AM. **B.** Mesure de l'intensité de fluorescence au niveau du corps cellulaire. **C.** Calcul de la dérivée du signal de fluorescence. **D.** Représentation de la série de potentiels d'action.

II.3. Détection des neurones inhibiteurs par immunocytochimie dirigée contre le GABA et la GAD 65

II.3.1. Protocole d'immunocytochimie

II.3.1.1. Anticorps

Nous avons utilisé deux anticorps conjointement pour repérer la présence de neurones inhibiteurs. L'anticorps monoclonal produit chez la souris MAb GAD-6 (Boehringer Mannheim) spécifique de l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD 65kD a été utilisé à une dilution de 1:400. L'anticorps polyclonal produit chez le lapin qui reconnaît le GABA (SIGMA, référence A2052) a été utilisé à la dilution de 1:10 000. Les anticorps secondaires ont été obtenus chez Molecular Probes. Nous avons utilisé à la même dilution de 1:400 un anticorps de type IgG dirigé contre les épitopes de souris et couplé à l'Alexa Green et un anticorps dirigé contre les épitopes de lapin et couplé au Cy3.

II.3.1.2. Immunocytochimie

Les neurones ont été fixés avec une solution contenant 4% de formaldéhyde, et 4% de sucrose dans du PBS pendant 15 min à 37°C puis perméabilisés avec 0.25% de Triton X-100 pendant 5 min. Après une pré-incubation dans une solution de PBS contenant 10% de sérum des espèces secondaires pendant 30 minutes, les cultures ont été incubées avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les deux anticorps étaient incubés ensemble. Des contrôles ont été effectués systématiquement sur des cultures standard. Ils consistaient à ne pas incuber les anticorps primaires, et à réaliser indépendamment un marquage pour chaque anticorps primaire afin de s'assurer que le marquage des deux anticorps n'interfèrent pas.

II.3.2. Un marquage caractéristique des neurones inhibiteurs

Dans les expériences d'imagerie calcique les neurones inhibiteurs sont repérés en immunocytochimie par un double marquage avec un anticorps monoclonal dirigé contre une enzyme de synthèse du GABA, la GAD65 (Glutamate Acid Decarboxylase de poids moléculaire 65kD), et un anticorps polyclonal dirigé contre le neurotransmetteur GABA lui-même. Dans les cellules inhibitrices, le marquage du GABA est intense et homogène dans le milieu intracellulaire (voir Fig. II-9B). Mais il existe du bruit de fond dans les cellules excitatrices lié à la réaction de l'anticorps avec le glutamate (voir Fig. II-9B). Un double

marquage est donc nécessaire pour confirmer la nature des neurones. La GAD 65 est présente dans le corps cellulaire des neurones ainsi que dans les terminaisons de l'axone (voir Fig. II-9A) si bien que le marquage forme une tache intense caractéristique dans le corps cellulaire des neurones inhibiteurs. Un marquage ponctuel est visible également sur l'ensemble des neurites révélant la présence de synapses inhibitrices. La spécificité du marquage des neurones avec l'anti-GAD 65 permet de reconnaître sans hésitation les neurones GABAergiques.

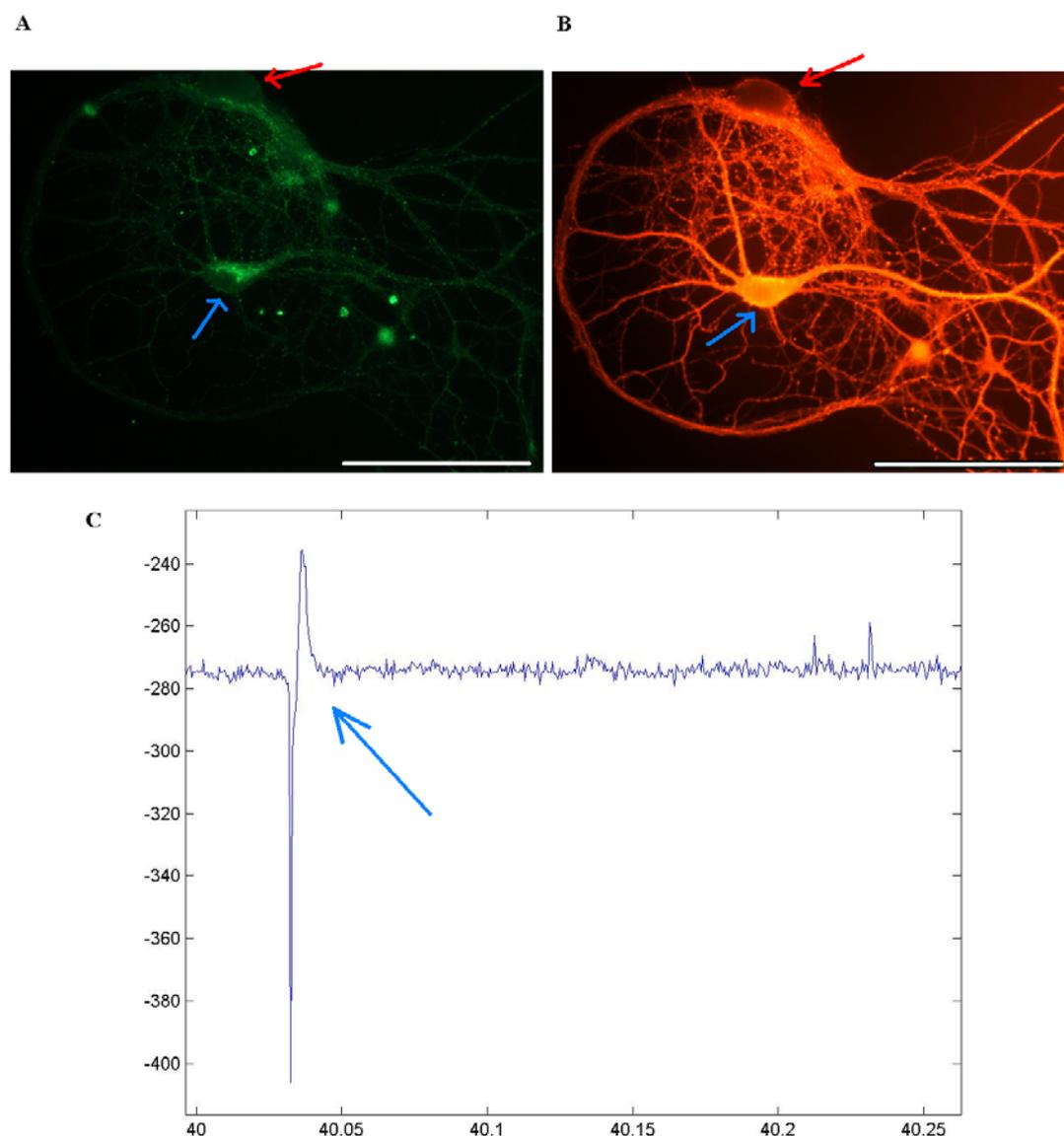


Figure II-9. Identification d'un neurone inhibiteur dans les réseaux d'architecture contrôlée. **A.** Marquage avec un anticorps monoclonal dirigé contre la GAD 65 révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Green (vert). Le corps cellulaire du neurone inhibiteur (flèche bleue) montre une grosse tache de marquage, ses terminaisons synaptiques marquées constitue un marquage ponctuel réparti sur l'ensemble des neurites. Le corps cellulaire du neurone adjacent sur le disque (flèche rouge) est dépourvu de marquage. **B.** Marquage avec un anticorps polyclonal dirigé contre le GABA et révélé par un anticorps secondaire couplé à Cy3 (rouge). Le corps cellulaire ainsi que les dendrites du neurone inhibiteur (flèche bleue) sont fortement marqués. Néanmoins le neurone adjacent excitateur (flèche rouge) montre un bruit de fond important. Les images sont prises avec un objectif x20, la barre d'échelle représente 50 μ m. **C.** Signal typiquement enregistré pour une cellule inhibitrice dans les réseaux de neurones d'architecture contrôlée. On note l'absence d'autapses excitatrices (flèche bleue).

II.3.3. Confirmation par l'électrophysiologie : une signature caractéristique dans les enregistrements en configuration cellule attachée

Le couplage d'enregistrements en configuration cellule attachée puis en cellule entière à l'approche d'immunocytochimie a confirmé l'identification des neurones inhibiteurs révélée par le double marquage du GABA et de la GAD 65 (Fig. II-9). Nous avons noté que la forme des potentiels d'action mesurés en configuration cellule attachée était très spécifique pour les cellules inhibitrices (voir Fig. II-9C). Ce signal reflète l'absence d'une autapse excitatrice et à la signature caractéristique d'une autapse inhibitrice après le potentiel d'action.

III. INITIATION ET MAINTENANCE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE DANS LES RESEAUX EXCITATEURS ISOLES *in vitro*

Objectifs

Mon travail a eu pour but de préciser les propriétés des synapses glutamatergiques qui sont nécessaires dans les réseaux excitateurs à l'initiation de l'activité spontanée et à sa maintenance à une fréquence contrôlée.

On considère généralement que l'activité est initiée par des cellules à la décharge autonome (Cohen and Miles, 2000). Cependant dans différents systèmes en culture, il apparaît que les propriétés synaptiques sont nécessaires à l'observation d'activité spontanée (Bacci et al., 1999; Harris et al., 2002b). Nous avons donc essayé d'explorer quelles étaient ces propriétés synaptiques, et en particulier le rôle de la libération spontanée.

Une fois initiée, on suppose que l'activité électrique se maintient dans le cortex ou l'hippocampe grâce aux décharges réverbérantes excitatrices permises par la structure récurrente du réseau (Amit et al., 1994). Dans le cortex préfrontal, l'activité persistante intervenant dans la mémoire de travail requiert la maintenance de l'activité des neurones excitateurs du cortex à des fréquences modérées, comprises entre 10Hz et 50Hz (Wang 2001). L'excitation réverbérante à l'origine de la persistance peut opérer à priori via des boucles récurrentes d'activation des neurones ou grâce aux propriétés des synapses glutamatergiques elles-mêmes. Si les propriétés des synapses sont à l'origine de la persistance, Wang a montré que ce sont les composantes lentes des synapses excitatrices qui permettent l'apparition d'intervalles de temps longs entre potentiels d'action (Inter Spike Intervals, ISIs) (Wang 1999). Selon lui, la cinétique de la composante la plus lente de la réponse synaptique détermine les ISIs les plus longs et donc la fréquence minimale de décharge spontanée. Nous avons donc cherché à étudier si effectivement des composantes synaptiques lentes pouvaient permettre de maintenir l'activité spontanée dans des réseaux où la propagation n'intervient pas. Nous avons ciblé plusieurs composantes de l'EPSP dont la cinétique est due à l'activation des récepteurs post-synaptiques (rapides : AMPA, et lentes : NMDA et métabotropiques).

Pour l'étude de l'initiation et de la maintenance dans les réseaux excitateurs, j'ai eu recours au modèle de réseau excitateur ultrasynchrone le plus simple, l'autapse glutamatergique (Bekkers and Stevens, 1991) et aux petits réseaux excitateurs composés d'une dizaine de neurones. L'autapse a été étudiée en détail car elle présente les avantages suivants : *i*) Un neurone glutamatergique isolé *in vitro* décharge spontanément (Bacci et al.,

1999); *ii*) L'autapse constitue un modèle de réseau neuronal excitateur simplifié et ultrasynchrone, puisque toutes les synapses sont activées ensemble dans la milliseconde qui suit l'émission d'un potentiel d'action (Bekkers and Stevens, 1991). Ainsi il est possible d'établir précisément un lien entre la dynamique de l'activité spontanée et la cinétique des réponses synaptiques ; *iii*) Puisque toute l'activité provient uniquement de ce neurone isolé, on s'affranchit des propriétés de réseaux pour ne considérer que les propriétés synaptiques. La persistance de l'activité via des mécanismes de réverbération de l'excitation ne peut provenir que des synapses que le neurone fait sur lui-même. Dans les réseaux excitateurs composés d'une dizaine de neurones, on observe aussi de l'activité spontanée et comme l'activation des cellules n'est pas strictement synchrone, les propriétés de propagation dans les boucles excitatrices peuvent alors rentrer en jeu.

Méthodologie

La technique d'obtention des réseaux d'architecture contrôlée (voir chapitre I) permet de produire des autapses et des réseaux neuronaux à haute densité. Pour une cellule isolée, l'activité spontanée est enregistrée par la méthode de patch clamp en configuration cellule attachée. Pour un réseau pluricellulaire, l'activité électrique de chaque neurone est estimée à partir du signal d'imagerie calcique au niveau du corps cellulaire (voir chapitre II). La nature glutamatergique des neurones est établie *a posteriori* (lors du passage en configuration cellule entière pour une cellule isolée, et par immunocytochimie pour un réseau pluricellulaire).

Présentation

III.1. Initiation et maintenance sont des phénomènes indépendants

III.1. 1. Des bouffées caractéristiques dans les réseaux excitateurs

Dans les réseaux excitateurs, l'activité spontanée apparaît après une semaine en culture, sous forme de potentiels d'action isolés associés à des variations brèves de l'intensité de fluorescence du Fura 2. Ces potentiels d'action n'apparaissent pas forcément dans l'ensemble des neurones du réseau (Fig. III-1). Après deux semaines, les réseaux pluricellulaires (Fig. III-3,4,5) comme l'autapse (Fig. III-2), font spontanément des bouffées de potentiels d'action durant plusieurs secondes et séparées par de longs silences. Les variations de la concentration de calcium intracellulaire associées aux bouffées sont massives (Fig. III-2,3,4,5).

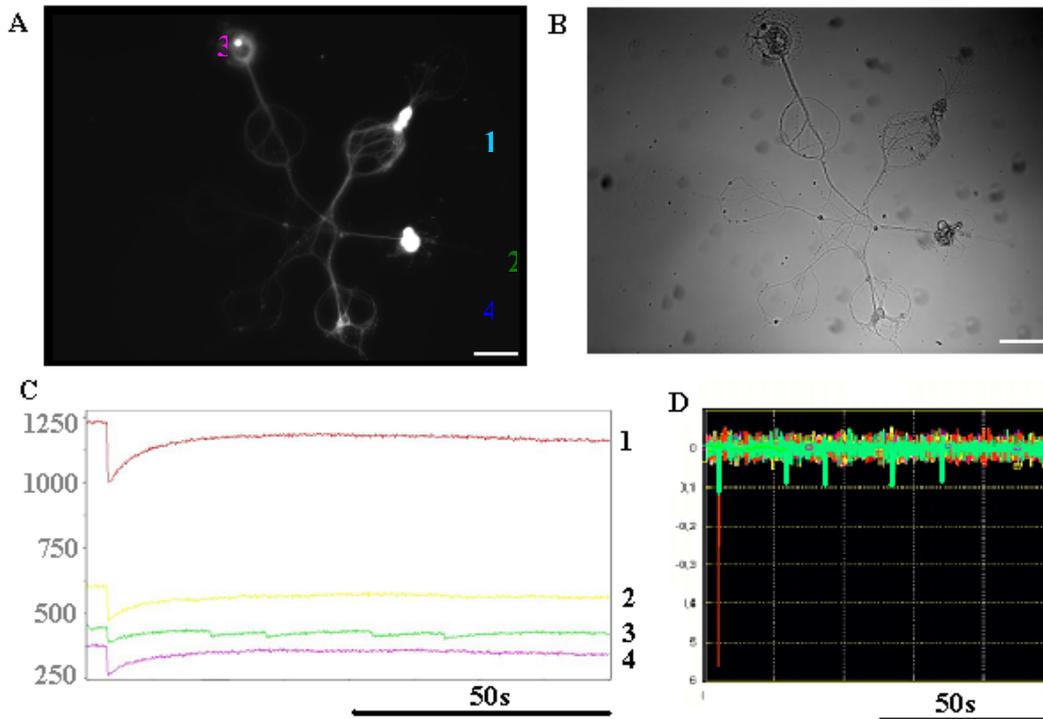


Figure III-1. Activité spontanée d'un réseau de 4 cellules après 10 jours en culture. A. Image de fluorescence des neurones chargés par le Fura 2 AM. B. Image du réseau par contraste interférométrique différentiel (DIC). C. Une diminution rapide de l'intensité de fluorescence du Fura 2 mesurée pour chaque soma est associée à un potentiel d'action (unités arbitraires). La dérivée du signal (D) montre que les neurones s'activent ensemble puis seul un neurone décharge (trace verte, neurone 3). La barre d'échelle est égale à 50 μ m.

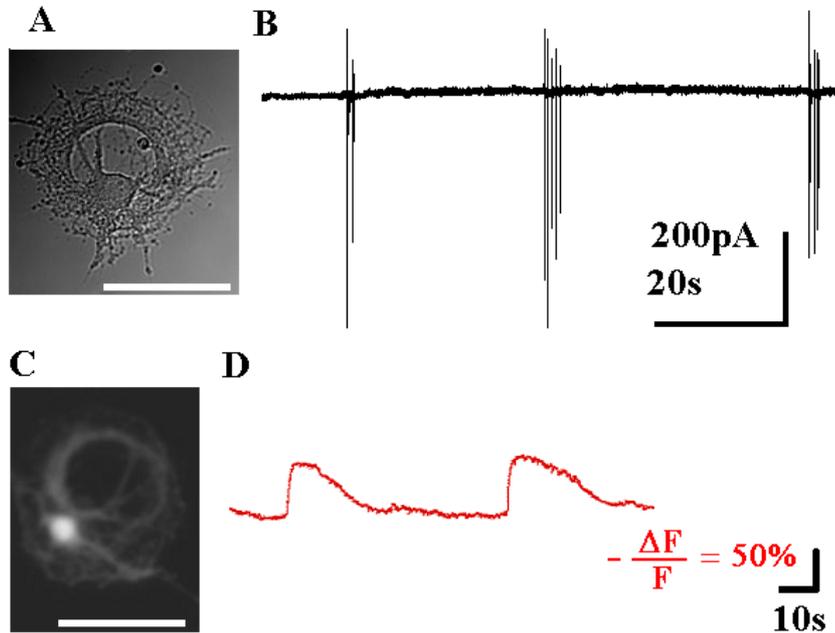


Figure III-2. L'activité spontanée d'autapses glutamatergiques montre après 2 semaines en culture des bouffées de potentiel d'action caractéristiques séparées par de longs silences. A. Image DIC d'une autapse. B. Enregistrement électrophysiologique en configuration cellule attachée. C. Image de fluorescence d'une autapse après marquage au Fura 2 AM. D. Variations relatives de l'intensité de fluorescence du Fura 2. La barre d'échelle est toujours égale à 50 μ m.

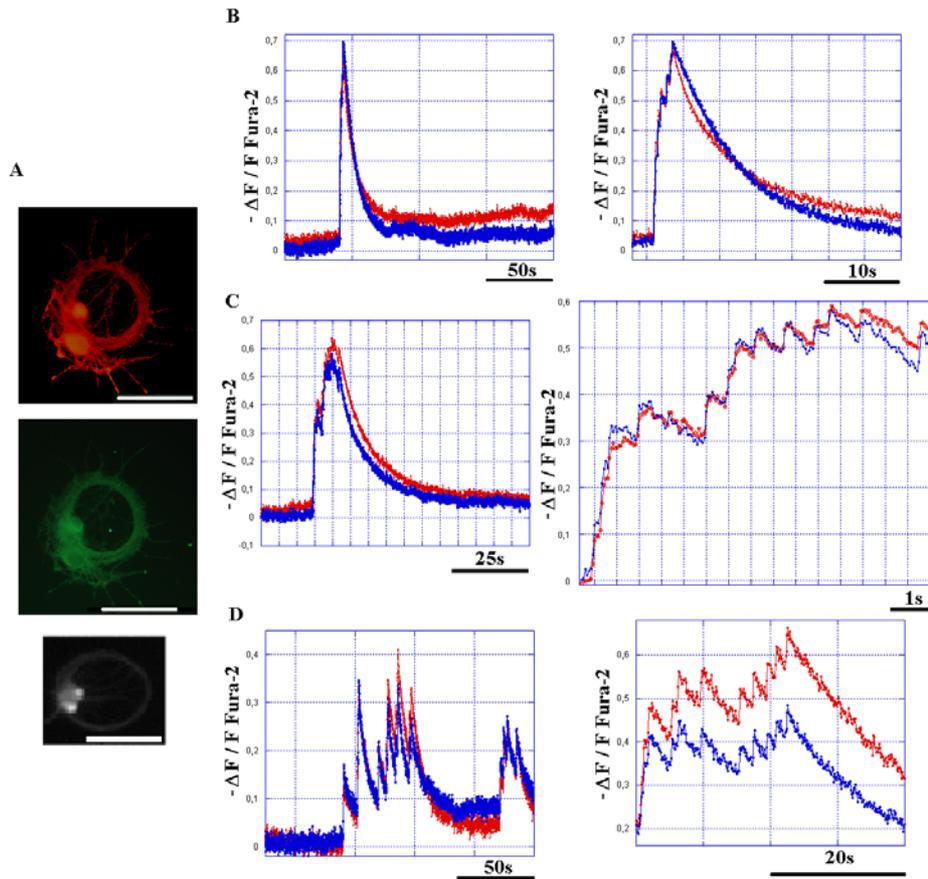


Figure III-3 . L'activité d'une paire de neurones excitateurs à 14DIV montre des bouffées successives. A . L'immunodetection du GABA (rouge) et de la GAD 65 (vert) ne montre pas de marquage spécifique : les deux neurones sont excitateurs. En dessous, image de fluorescence des cellules chargées en Fura 2 AM. **B-D.** Les variations relatives de la concentration en calcium intracellulaire sont mesurées dans les corps cellulaires (traces rouge et bleue). A droite, le grossissement du signal au début d'une bouffée montre les potentiels d'action individuels : le timing est très similaire pour les deux neurones. La barre d'échelle est toujours égale à 50 μ m.

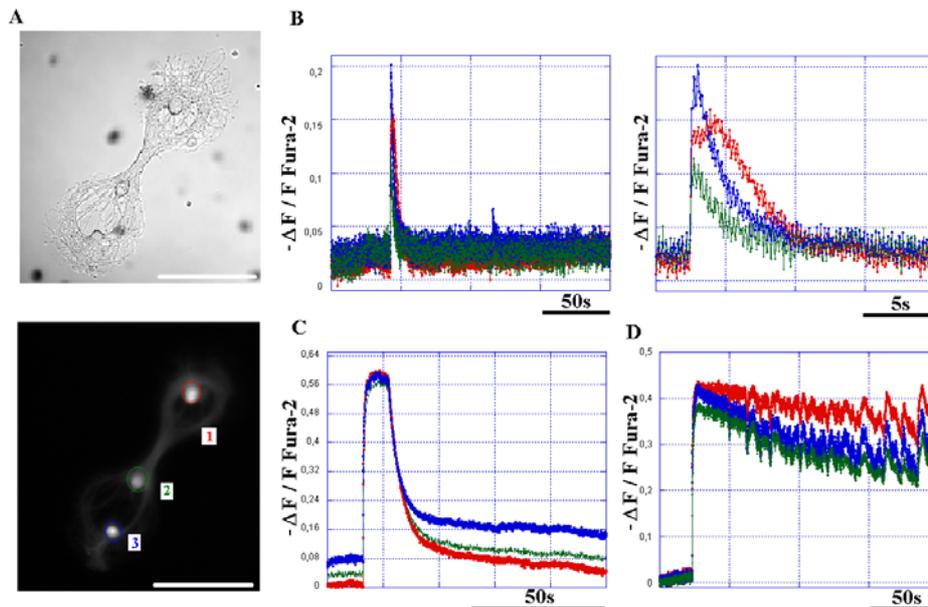


Figure III-4. Des bouffées de potentiels d'action dans des réseaux de 3 neurones excitateurs matures (22DIV). A. Image DIC (haut) et de fluorescence (bas) du triplet étudié après marquage des cellules en Fura 2 AM. Les traces des neurones 1, 2 et 3 sont rouge, verte et bleue respectivement. **B-D.** La variation relative d'intensité de fluorescence du Fura 2 ($-\Delta F / F$) dans les corps cellulaires est similaire pour les trois neurones. La barre d'échelle est toujours égale à 50 μ m.

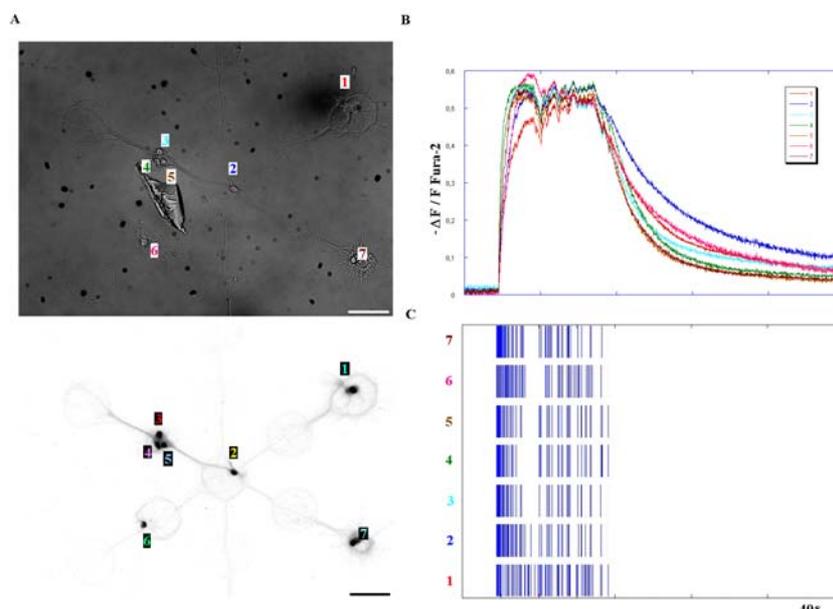


Figure III-5. Bouffée collective de potentiels d'action d'un réseau de neurones excitateurs (avec 7 cellules à 18 DIV). **A.** Image DIC (haut) et négatif de l'image de fluorescence du Fura 2 (bas). **B.** Les variations de l'intensité de fluorescence révèlent une bouffée collective. **C.** Raster Plot correspondant (même échelle de temps en B et C). La barre d'échelle est égale à 50 μ m.

III.1.2. Similarité de l'activité spontanée et persistante

La stimulation électrique brève en configuration cellule attachée d'une autapse ou d'une cellule d'une paire isolée conduit à une bouffée de potentiels d'action qui dure plusieurs secondes et qui est similaire à une bouffée spontanée (voir Fig. III-6) : la cellule rentre dans le même état d'activation auto-entretenu. Les mécanismes d'initiation et de maintenance de l'activité spontanée sont donc indépendants, et l'activité spontanée est un modèle d'étude de la persistance de l'activité électrique.

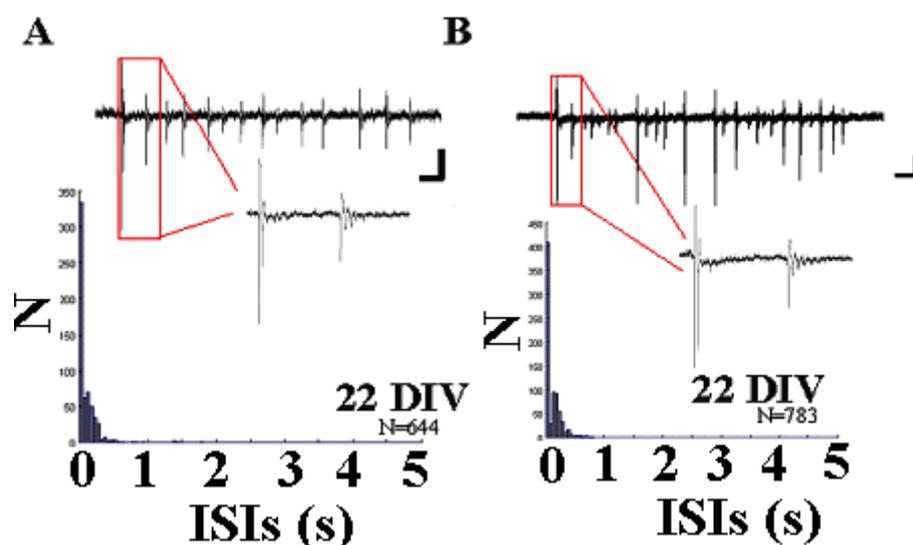


Figure III-6. Similarité de l'activité spontanée et persistante d'une autapse glutamatergique (22 DIV). Enregistrements en configuration cellule attachée d'une bouffée spontanée (A) et évoquée (B, stimulation extracellulaire : 1nA, 5ms). Détail de deux potentiels d'action successifs et histogramme des ISIs. Echelle : 200ms, 25pA.

III.2. L'initiation de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs requiert le bruit synaptique

III.2. 1. Dans les autapses glutamatergiques

Nous avons montré que la libération spontanée de glutamate était critique pour l'initiation de l'activité spontanée. En effet, l'application transitoire de l'antagoniste CNQX (100 μ M) des récepteurs du glutamate non-NMDA s'accompagne d'un arrêt total et réversible de l'activité (Fig. III-7).



Figure III-7. La décharge spontanée des autapses glutamatergiques nécessite le bruit des synapses glutamatergiques. Une cellule isolée spontanément active (trace du haut) ne décharge plus lorsque le CNQX (100 μ M) est appliqué dans le bain (trace du bas).

L'analyse des courants miniatures (mEPSCs) en présence de TTX (0.5 μ M) et d'APV (50 μ M) confirme ce résultat : l'amplitude et la fréquence des mEPSCs dans les cellules spontanément actives sont plus grandes que dans les cellules silencieuses au même âge (Fig. III-8). En particulier, les mEPSCs de grande amplitude (>100pA à -60mV) sont beaucoup plus fréquents dans les cellules actives, et leur temps de montée n'est pas supérieur à la moyenne (Fig. III-9). Cette observation suggère que ces grands événements ne résultent pas de la sommation d'événements multiples mais correspondent à la libération de glutamate provenant d'une seule vésicule à la synapse. Cette grande amplitude suggère que la synapse qui libère est proche du soma ou bien que le domaine post-synaptique contient un grand nombre de récepteurs excitateurs non-NMDA.

Les grands événements miniatures apparaissent dans les cellules actives avec une fréquence d'environ 0.01Hz proche de la fréquence des bouffées de potentiels d'action spontanément émises par la cellule. Cette correspondance et leur présence à plus haute fréquence dans les

cellules dites actives suggèrent que les courants miniatures de grande amplitude puissent déclencher le premier potentiel d'action d'une bouffée dans une cellule glutamatergique isolée.

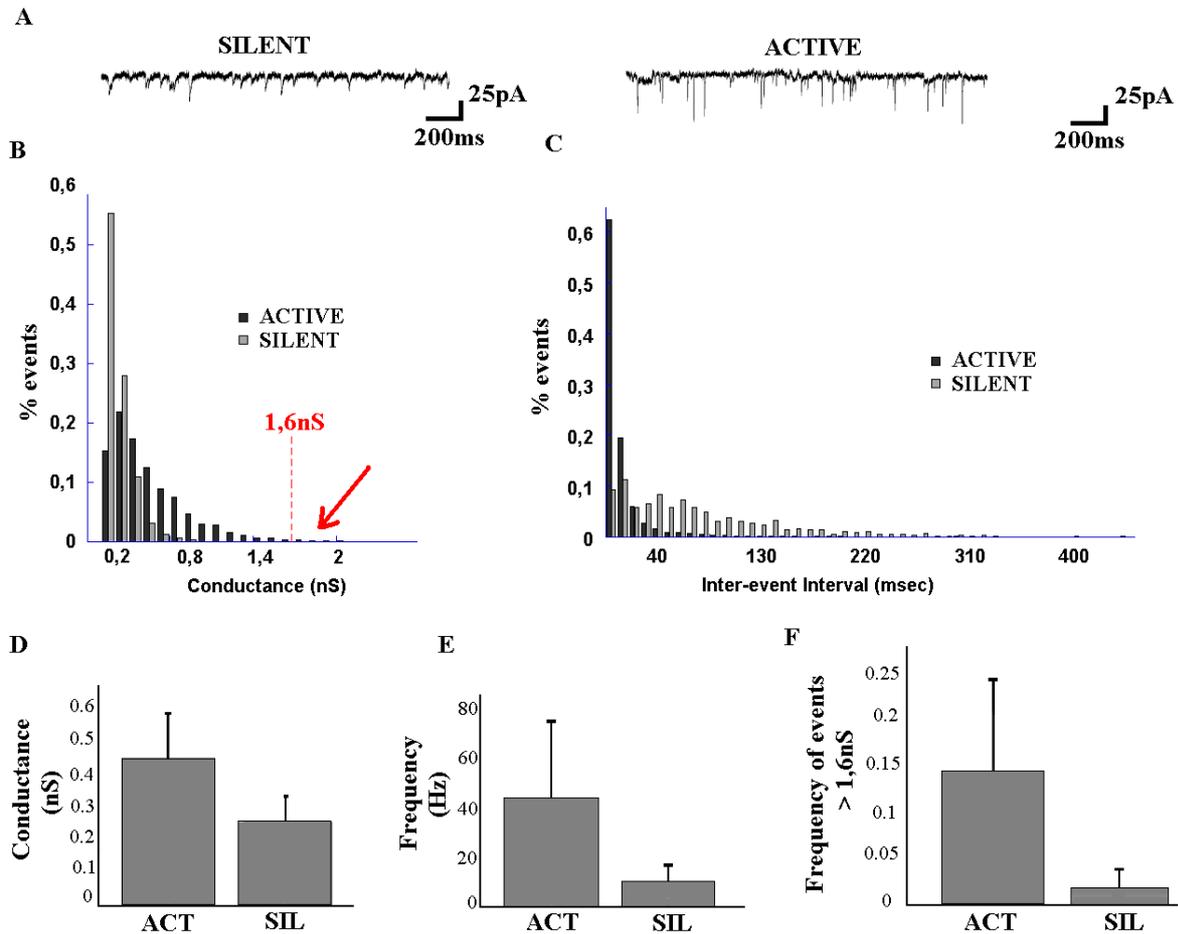


Figure III-8. Les événements miniatures (mEPSCs) enregistrés dans les autapses glutamatergiques spontanément actives sont caractérisés par des amplitudes et des fréquences plus élevées que ceux des cellules silencieuses au même âge. **A.** Enregistrement des mEPSCs dans une cellule silencieuse (gauche, 29DIV) et une cellule active (droite, 27 DIV). **B et C.** Distribution des conductances et des intervalles de temps entre événements (inter-event intervals, IEs) des mEPSCs des cellules représentées en A. Dans la cellule active, la distribution de conductances est décalée vers la droite et celle des IEs vers la gauche comparées à celles de la cellule silencieuse. Noter la longue queue de la distribution des conductances pour la cellule active (flèche rouge en B). **D et E.** Comparaison des moyennes des fréquences et conductances des mEPSCs dans 6 cellules silencieuses et 10 cellules actives. **F.** La fréquence d'apparition des grands événements (>1,6nS) est considérablement plus élevée dans les cellules actives.

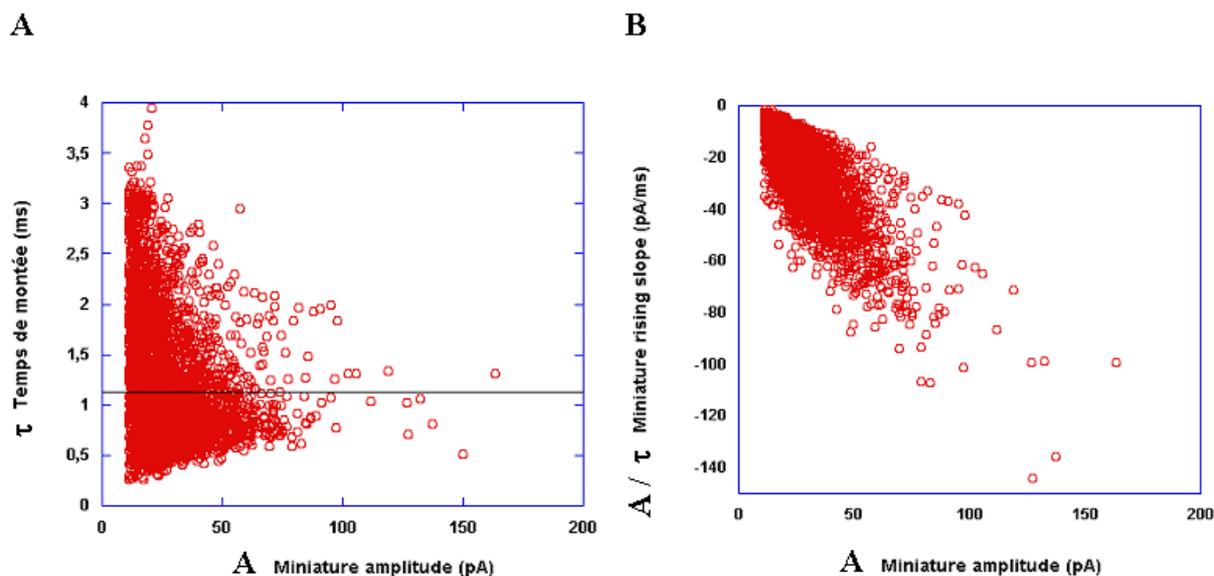


Figure III-9. Les événements miniatures de grande amplitude dans les autapses ne correspondent pas à la sommation d'événements multiples. Si un événement miniature est loin du soma, le filtrage dans l'arbre dendritique entraîne que son amplitude soit plus petite et que son temps de montée soit plus lent. Si un événement de grande amplitude provient de la sommation d'événements multiples, son temps de montée sera plus grand que la moyenne. Si il provient d'un événement unique, localisé proche du soma, son temps de montée ne sera pas plus élevé que la moyenne. A. Les temps de montée (τ , panneau A) et la pente de montée (A / τ , panneau B) des miniatures sont représentés en fonction de leur amplitude (A). Les temps de montée des événements de grande amplitude ne sont pas supérieurs à la moyenne (indiquée par une ligne horizontale noire en A). B. De même la pente (A / τ) augmente à peu près linéairement avec l'amplitude. Les événements de grande amplitude ne correspondent donc pas à des événements multiples, mais plus vraisemblablement à la libération spontanée de glutamate au niveau de synapses proches du corps cellulaire où se fait l'enregistrement.

III.2.2. Dans les réseaux glutamatergiques

Sur des réseaux âgés de plus de 2 semaines, l'application de CNQX (100 μ M) a pour conséquence l'arrêt de l'activité spontanée de façon réversible (voir Fig. III-10). Ainsi l'initiation de l'activité spontanée requiert, comme pour les autapses, la libération spontanée de glutamate. Afin de préciser les mécanismes d'initiation de l'activité, nous avons analysé les courants miniatures observés dans les réseaux excitateurs en présence de TTX (0,5 μ M). Au même âge, la fréquence des événements miniatures enregistrés entre les bouffées est en général environ 2 à 3 fois plus élevée que dans les autapses excitatrices (réseaux : entre 30Hz et 50Hz à 20DIV ; une autapse au même stade : entre 5 et 35Hz). Les fréquences élevées et l'absence de miniatures de grande amplitude dans nos enregistrements suggèrent que l'activité spontanée dans un réseau soit initiée par sommation d'événements multiples.

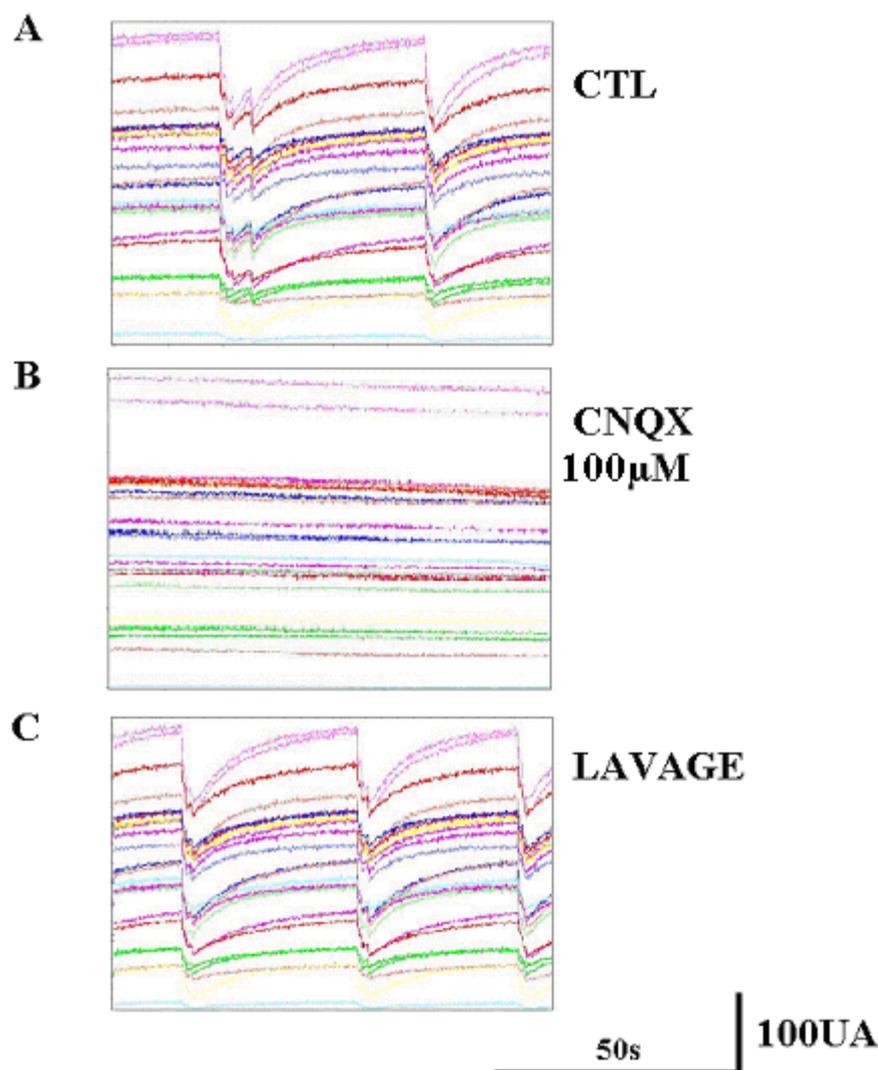


Figure III-10. L'application de CNQX 100 μ M suspend réversiblement l'activité de réseaux de neurones excitateurs. L'activité spontanée d'un large réseau composé de 20 neurones (19DIV) avant (A), pendant (B) l'application de CNQX (100 μ M) et après lavage de la drogue (C). On remarque que des bouffées de potentiels d'action (CTL) s'arrêtent pendant l'application (CNQX) et reprennent avec les mêmes caractéristiques après le lavage de la drogue (LAVAGE).

Une fois que l'activité est initiée dans une cellule du réseau, il faut qu'elle se propage au reste des neurones. Dans les réseaux de 7 à 8 neurones, on observe parfois qu'un neurone ou un groupe de neurones devance les autres lors du démarrage de la bouffée. Mais lors de bouffées successives dans un même réseau, les neurones qui initient l'activité ne sont en général pas les mêmes (Fig. III-12) : il n'y a pas de neurone spécifiquement « initiateur ».

Pour une paire de neurones isolée², le début d'une bouffée en imagerie calcique (i.e. avec une résolution de 50ms) est observé simultanément pour les deux, tandis qu'avec les doubles enregistrements en patch clamp on peut voir qu'il existe un décalage de 10 à 15ms entre les potentiels d'action des deux neurones (potentiels d'action spontanés, Fig. III-11 et évoqués Fig. III-12).

² Dès 2 semaines les neurones sont connectés entre eux (hétéro-synapses) et sur eux-mêmes (autapses). Les valeurs des EPSCs réciproques (9,3nS \pm 2,7nS, n=6) et autaptiques (10,1nS \pm 4,4nS, n=6) sont proches.

Lors du démarrage d'une bouffée, les neurones d'un réseau excitateur sont tous activés dans une fenêtre de 50ms à 100ms (voir Fig. III-13, III-14). Cela signifie que si l'activité apparaît dans un des neurones du réseau, elle se propage au reste du réseau dans un délai inférieur à 50ms. La stimulation d'une seule cellule du réseau pendant un silence confirme que l'activation d'une seule cellule conduit à l'activation de tous les autres neurones du réseau dans une fenêtre de 50ms en général (voir Fig. III-15).

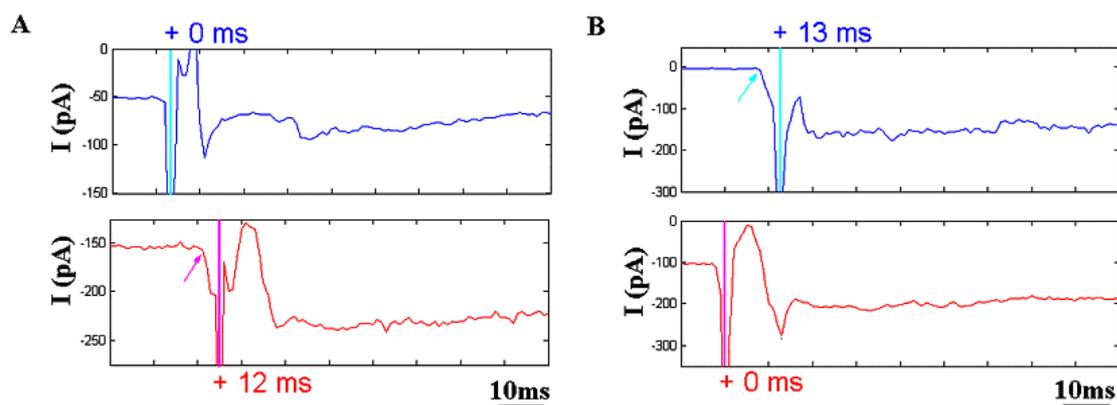


Figure III-11. Décalage temporel entre les potentiels d'action spontanés des deux neurones excitateurs d'une paire. L'enregistrement simultané de deux neurones d'une paire isolée montre que chaque neurone peut initier une bouffée et stimuler en moins de 15ms son partenaire. Les neurones N1 et N2 sont enregistrés en configuration cellule attachée (traces bleue et rouge). Le signal de chacun est agrandi dans une fenêtre de 100ms au début de deux bouffées. **A.** Bouffée où N1 s'active en premier et stimule N2 qui décharge 12ms après N1. L'EPSP_{1->2} est visible sur la trace rouge (flèche rose). **B.** Bouffée où N2 s'active en premier et stimule le N1 qui décharge 13ms après N2. L'EPSP_{2->1} est visible sur la trace bleue (flèche cyan).

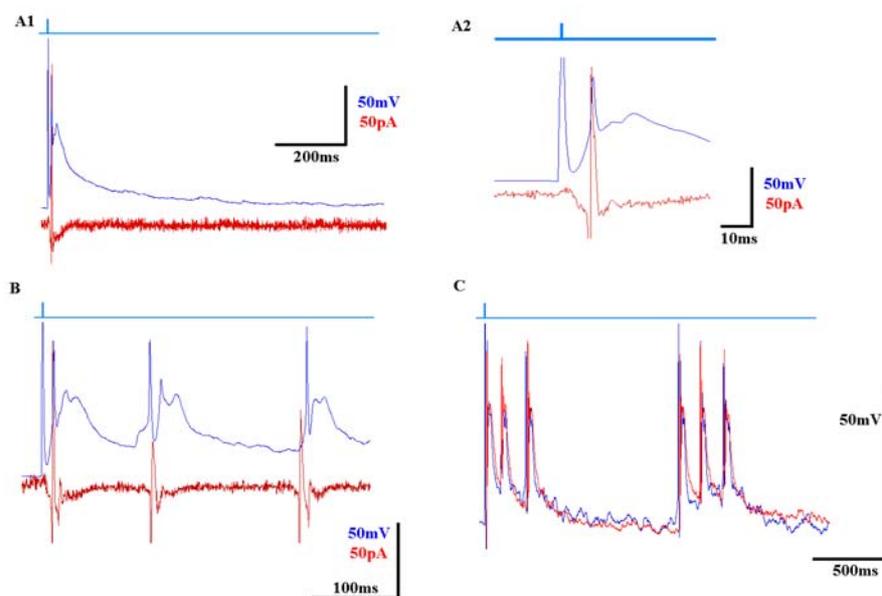


Figure III-12. Décalage temporel entre les potentiels d'action de deux neurones d'une paire après stimulation d'une des cellules (13DIV). A-C. La cellule 1 enregistrée en courant imposée est stimulée une fois au début de l'enregistrement (créneau, trace bleue) et la cellule 2 est enregistrée en configuration cellule attachée. **A1.** 10ms après la stimulation de la cellule 1 survient un potentiel d'action dans la cellule 2 (trace rouge). Agrandissement de A1 en A2. **B.** Après la stimulation de la cellule 1, l'activité peut persister sous forme de potentiels d'action séparés par 150 à 350 ms. **C.** Après perforation de la cellule 2, réponses des deux cellules en courant imposé. L'activité persiste sur quelques secondes après la stimulation et les variations du potentiel des cellules 1 et 2 sont très similaires. L'activation de la cellule non stimulée suit toujours la première en moins de

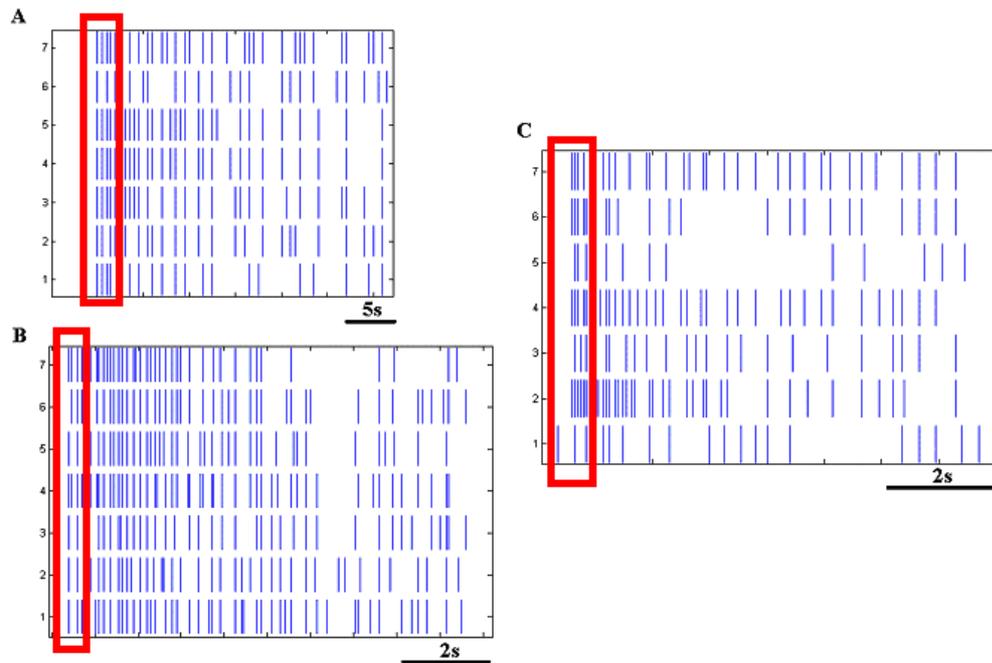


Figure III-13. L'activation des neurones au démarrage d'une bouffée dans un réseau excitateur est collective. A-C. Les Raster Plots pour 3 réseaux distincts montrent que la plupart des neurones s'activent dans une fenêtre de temps de 50ms au début d'une bouffée.

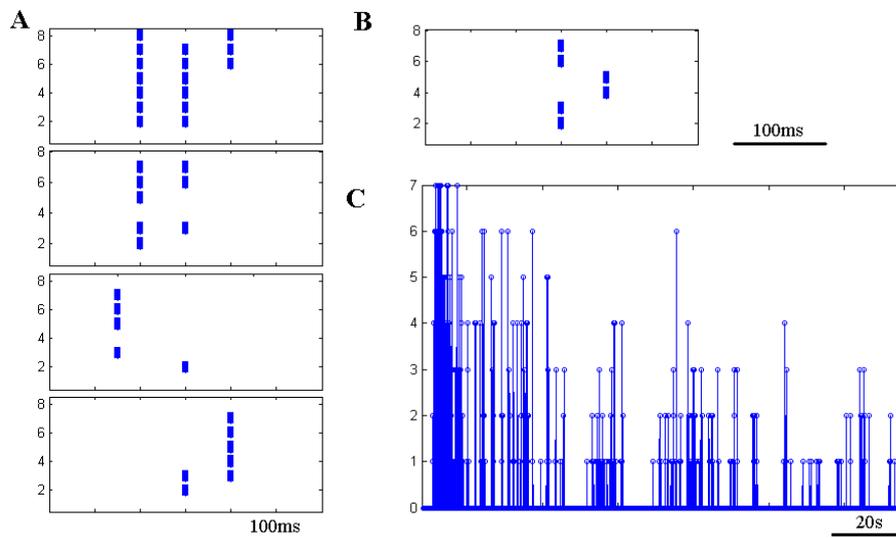


Figure III-14. Evolution de la synchronisation des neurones au cours d'une bouffée de potentiels d'action. A,B. Démarrage de 5 bouffées successives dans un réseau excitateur de 8 neurones : les neurones ne s'activent pas toujours dans la même fenêtre de 50ms. Les premiers neurones à s'activer changent à chaque bouffée. **C.** Nombre de neurones actifs ensemble dans une fenêtre de 50ms au cours d'une bouffée : au début, le nombre de neurones actifs dans une fenêtre de 50ms est maximal (7) puis décroît pour être minimal à la fin de la bouffée.

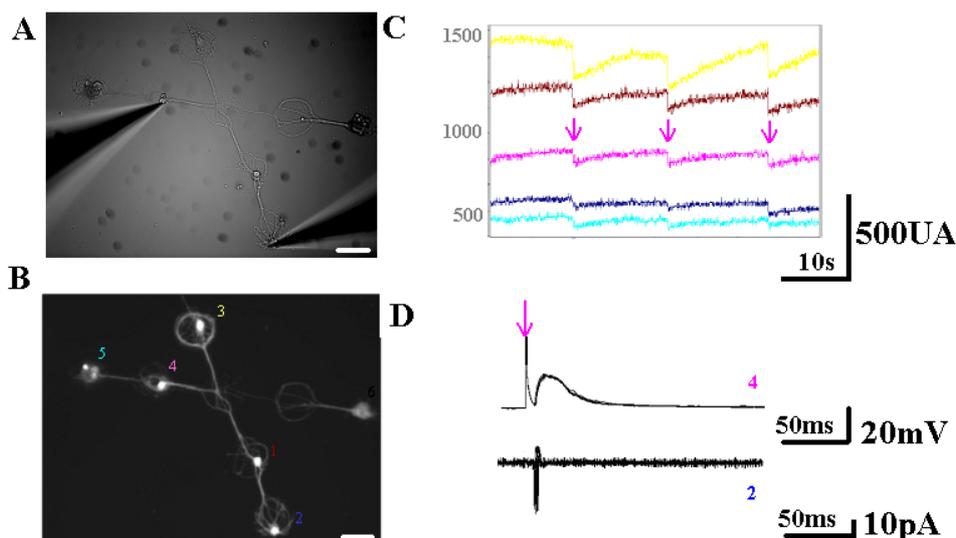


Figure III-15. L'évocation d'un potentiel d'action dans un neurone suffit en général à entraîner le reste des neurones dans un réseau excitateur âgé de 3 semaines (21 DIV). A et B. Images du réseau en DIC et en fluorescence (B) après marquage avec le Fura-2 AM. La barre d'échelle représente 50 μ m. Le neurone 4 (trace rose) est enregistré en configuration cellule entière et le neurone 2 (trace du bas) en configuration cellule attachée. C. Variations de fluorescence données en unités arbitraires au cours du protocole de stimulation de la cellule 4. A chaque stimulation du neurone 4, l'ensemble du réseau décharge simultanément. D. Un potentiel d'action évoqué dans le neurone 4 enregistré en cellule entière déclenche systématiquement un potentiel d'action chez le neurone 2 enregistré en cellule attachée. Le délai entre les potentiels d'action des neurones 4 et 2 varie de 7 à 13ms. Ce temps bref suggère que le neurone 4 forme des synapses directement sur le neurone 2 et que l'EPSP qui en résulte est suffisant pour déclencher un potentiel d'action chez le neurone 2.

Après l'initiation, l'activité concerne en général l'ensemble du réseau. La synchronisation des neurones est maximale au début d'une bouffée et diminue ensuite au cours de la bouffée (Fig. III-14C).

III.3. Maintenance de l'activité électrique

Nous allons d'abord expliciter le cas des autapses, puis nous verrons que ce que nous avons montré pour les autapses dans les cellules isolées est généralisable aux hétéro-synapses dans les paires de neurones isolées.

III.3.1. Dans les réseaux excitateurs ultra-synchrones (autapses)

La maintenance, comme l'initiation, requiert à tous les stades de la culture l'activation des récepteurs de type AMPA : en présence de CNQX (100 μ M), le déclenchement d'un potentiel d'action par la pipette de patch clamp en configuration cellule attachée n'est pas suivi d'une bouffée. Cependant nous allons voir que l'activité du récepteur AMPA seule ne suffit pas à la maintenance de l'activité.

Chaque cellule décharge dans une gamme privilégiée de fréquences (Fig. III-16). La fréquence privilégiée diminue avec l'âge : de 10 Hz (basse fréquence) dans des cellules de 2 semaines à 2 Hz (très basse fréquence) pour des cellules entre 3 et 4 semaines. Nous avons cherché si des composantes synaptiques contribuent au maintien de l'activité aux fréquences basses et très basses, et si oui, lesquelles.

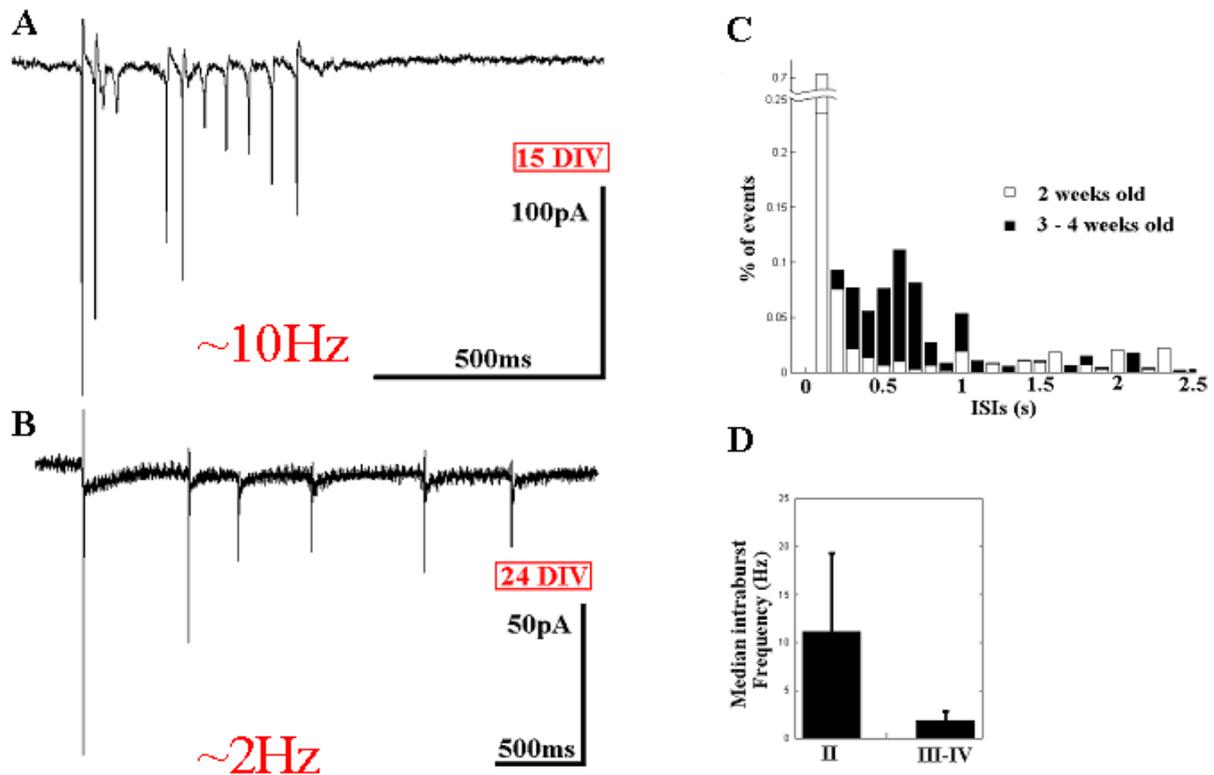


Figure III-16. Une autapses glutamatergique décharge dans une gamme de fréquences caractéristique selon son âge. A-B. Enregistrement en configuration cellule attachée. Cellule à 2 semaines (A, 15DIV) décharge autour de 10Hz, tandis qu'une cellule à 3 semaines (B, 24DIV) décharge autour de 2Hz. C-D. Distribution des ISIs (C) et histogramme des fréquences médianes de décharge des cellules à 2 et à 3-4 semaines.

III.3.1.1. Persistance à basse fréquence

Une cellule active à basse fréquence ($\sim 10\text{Hz}$) a un EPSP de faible amplitude avec une cinétique rapide (voir Fig. III-17) et caractérisée par une composante AMPA (sensible à l'application de CNQX) et une composante NMDA (sensible à l'application de MK801/APV). Dans ces cellules, l'activation des récepteurs NMDA est cruciale pour maintenir l'activité après un premier potentiel d'action émis spontanément : en bloquant les récepteurs NMDA avec le cocktail APV/MK801, l'activité spontanée ne persiste plus sous forme de bouffées (voir Fig. III-18).

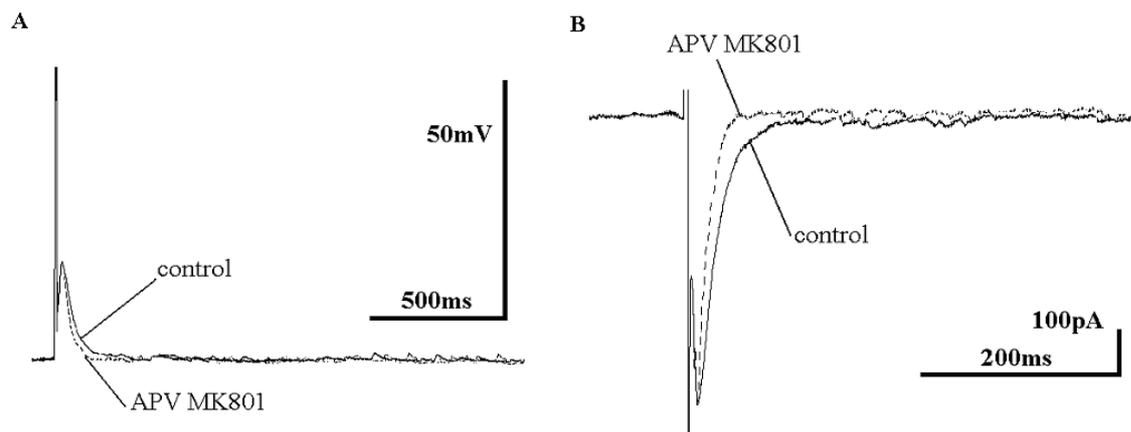


Figure III-17. Cinétique rapide de l'EPSP d'une cellule à 2 semaines. A. L'EPSP a une amplitude inférieure à 40mV, une composante rapide AMPA (~10ms) et une lente NMDA (~100ms) sensible à l'APV/MK801. B. L'application d'APV/MK801 supprime la composante lente de l'EPSC.

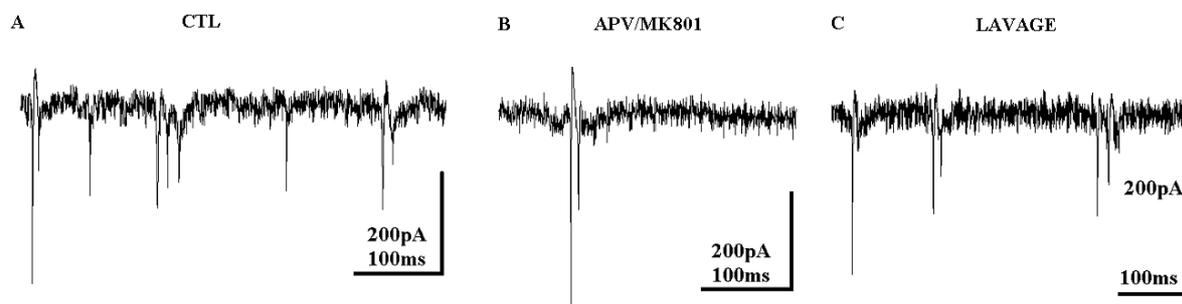


Figure III-18. L'activation des récepteurs NMDA est nécessaire à l'expression de bouffées de potentiels d'action. A-C. Enregistrements électrophysiologiques en configuration cellule attachée d'une cellule à 2 semaines en situation contrôlée (A), pendant l'application de MK801/APV (B) et après lavage (C). On observe qu'une cellule à 2 semaines ne fait plus que des potentiels d'action isolés en APV/MK801.

III.3.1.2. Persistance à très basse fréquence

Dans les cellules spontanément actives à très basses fréquences, l'EPSP a une grande amplitude et montre une composante extrêmement lente (de l'ordre d'une seconde) qui n'est pratiquement pas sensible à l'application de MK801/APV dans le bain (Fig. III-19). Cette composante très lente est composée d'une composante continue (lente dépolarisation) et discrète (libération asynchrone de glutamate). La composante lente continue est sensible à l'EGTA-AM, au MCPG et à la nifédipine³. Cela suggère qu'elle est due à l'activation de la conductance cationique non sélective, I CAN (Congar et al., 1997) grâce à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire consécutive à l'activation de mGluR 1 ou 5 ou de l'entrée de calcium via les canaux calciques voltage dépendant de type L. La composante discrète est sensible à l'EGTA-AM.

³ Contribution variable en fonction des cellules, résultats non montrés ici.

Le blocage pharmacologique des récepteurs NMDA n'empêche pas une activité soutenue d'avoir lieu, mais rend la décharge des neurones plus irrégulière et rallonge les ISIs (Fig.III-20). Et l'incubation des cellules avec la forme acétoxy-méthyl de l'EGTA (15 minutes, à 50 μ M) supprime les ISIs longs qui caractérisent la décharge de ces cellules habituellement (Fig.III-21).

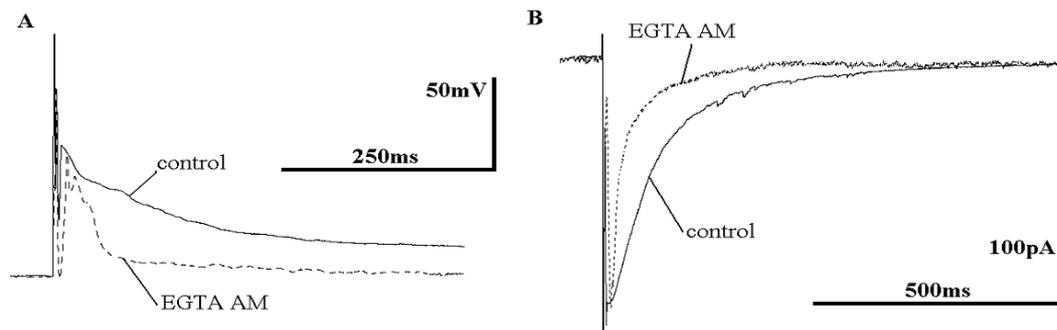


Figure III-19. Cinétique lente de l'EPSP d'une cellule isolée (âgée de 2 semaines *in vitro*). A. En courant imposé, l'EPSP d'amplitude 60mV (il atteint le potentiel de réversion AMPA) a une décroissance rapide et une extrêmement lente (de l'ordre de 1s) sensible à l'EGTA-AM. B. En potentiel imposé, l'incubation avec l'EGTA-AM supprime la composante très lente normalement observée pour les cellules âgées de 3 à 4 semaines.

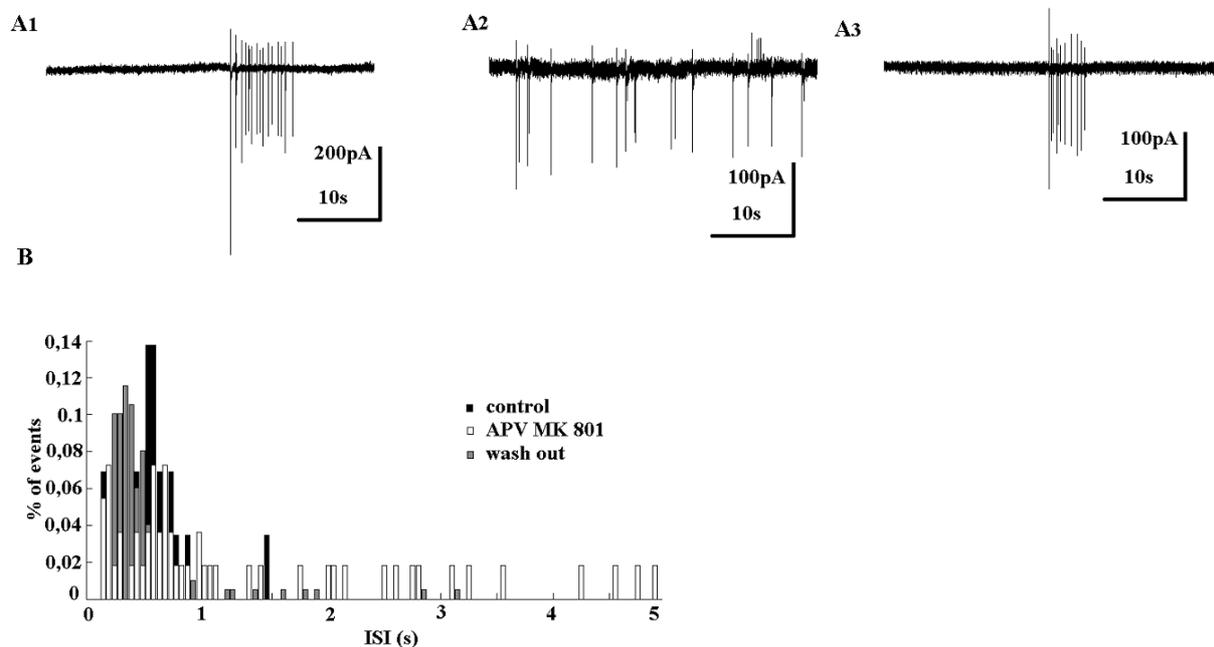


Figure III-20. L'activation du récepteur NMDA chez les cellules âgées permet l'expression de bouffées régulières. A1-3. Enregistrements en configuration cellule attachée avant (A1), pendant (A2) et après (A3) l'application de MK801/APV. B. Histogramme des ISIs correspondant : l'application d'APV/MK801 entraîne la dispersion des ISIs et avec en particulier des intervalles longs.

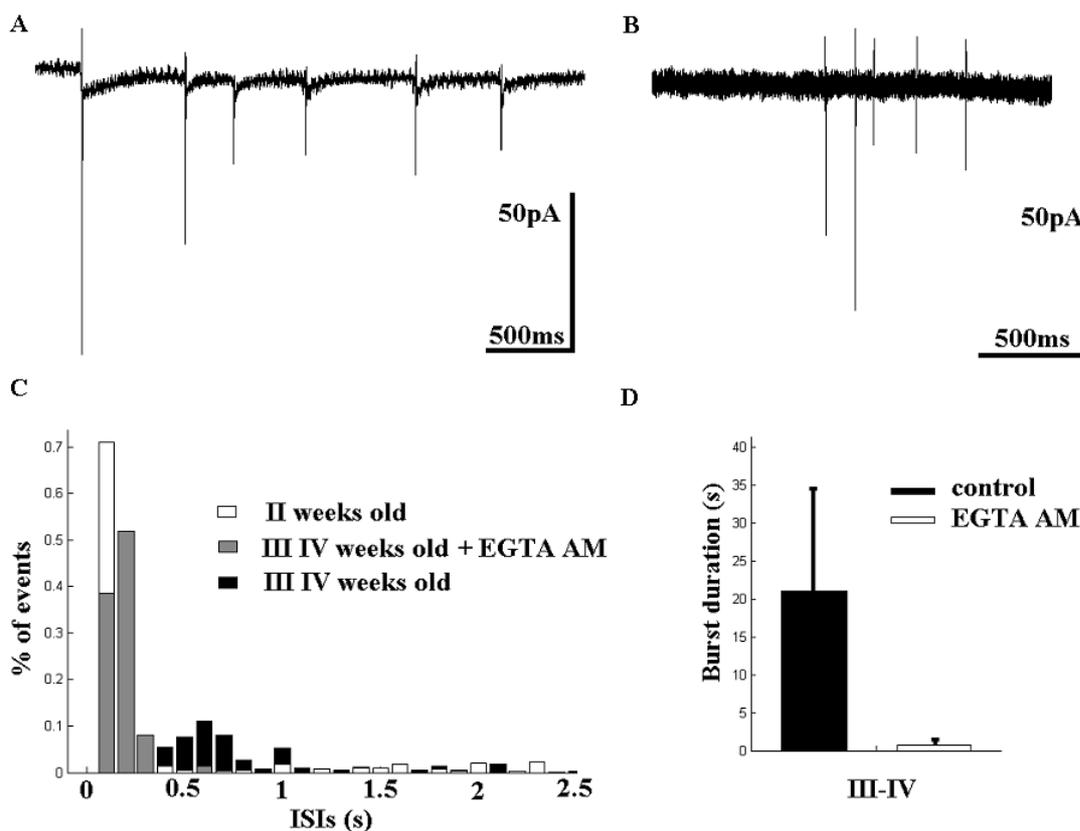


Figure III-21. La chélation du calcium intracellulaire avec l'EGTA-AM supprime les intervalles de temps longs et raccourcit les durées des bouffées chez les cellules âgées. A1-3. Enregistrements en configuration cellule attachée d'une cellule contrôle (A) et d'une cellule précédemment incubée avec l'EGTA-AM (B). **B.** Histogramme des ISIs dans les conditions contrôle et avec EGTA-AM. L'incubation des cellules en EGTA-AM entraîne une suppression des intervalles longs (B) et une diminution de la durée des bouffées (C).

L'incubation en EGTA-AM (15 minutes, à 50 μ M) modifie la dynamique de l'activité spontanée : des cellules âgées de 3-4 semaines qui forment des bouffées à très basse fréquence génèrent alors des bouffées à basse fréquence observée chez les cellules à 2 semaines. Dans une cellule âgée de 3 à 4 semaines, l'activation de I CAN en post synaptique et la libération asynchrone de glutamate en présynaptique (chacun sensible à la chélation du calcium par l'EGTA-AM) agissent ensemble pour déclencher après des temps des potentiels d'action dans une bouffée :

- i) la libération asynchrone comme la conductance I CAN se prolonge sur 500ms à 1s ce qui correspond aux ISIs longs qui sont observés dans les bouffées de potentiels d'action des cellules matures ;
- ii) la suppression du récepteur NMDA entraîne une décharge *irrégulière* à basse fréquence ce qui suggère un rôle important de la libération asynchrone;
- iii) l'absence de longs ISIs en EGTA-AM montre que dans les conditions où le signal calcique est bloqué, il n'y a plus de persistance à basse fréquence;
- iv) la grande diminution de la durée des bouffées par l' EGTA AM.

La persistance de l'activité à très basse fréquence repose donc dans une moindre mesure sur l'activation des récepteurs NMDA. En revanche des mécanismes calcium dépendant (sensibles à l'EGTA AM) définissent la composante lente de l'EPSP : soit d'origine présynaptique (libération asynchrone de glutamate), soit d'origine postsynaptique (activation postsynaptique de la conductance I CAN (suite à l'activation des récepteurs métabotropiques de type I et V et l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant à haut seuil de type L).

Conclusion

La persistance de l'activité dans l'autapse à basse et très basse fréquence repose principalement de la composante NMDA pour les cellules qui déchargent à basse fréquence. Pour les cellules qui déchargent à très basse fréquence, l'augmentation de la concentration en calcium résiduel entraîne plusieurs mécanismes (libération asynchrone de glutamate et l'activation de la conductance I CAN) qui contribuent au maintien de l'activité électrique avec des intervalles de temps entre potentiels d'action très longs.

III.3.2. Pour les hétérosynapses dans des réseaux pluricellulaires

Les cellules d'une paire après deux semaines en culture déchargent spontanément⁴ à très basse fréquence (Fig. III-22, Fig. III-23). Dans 3 paires âgées de 13 à 18DIV, la distribution des ISIs s'étale jusqu'à 400ms (Fig. III-22A et B) et dans 3 paires âgées entre 22 et 29 DIV, la distribution des ISIs s'étale jusqu'à 800ms à 1s (Fig. III-23C). A partir de l'idée proposée par Rémi Monasson, j'ai vérifié si il y avait dans les réponses hétéro-synaptiques une composante lente discrète (libération asynchrone) et continue (activation d'une conductance lente) similaire à celle décrite dans les autapses. Lorsqu'un des neurones de la paire (N1) fait un train de potentiels d'action spontané (Fig. III-25A) ou évoqué (Fig. III-25B), on enregistre les courants reçus par N2 maintenue à potentiel imposé après le train de N1. Après le train, on constate une augmentation nette de la fréquence des événements miniatures qui dure pendant plusieurs secondes après le dernier potentiel d'action de la cellule active (Fig. III-25B). L'augmentation de libération asynchrone est donc une caractéristique commune aux autapses et aux hétéro-synapses.

⁴ L'activité spontanée se maintient dans une paire quand un neurone est enregistré en configuration cellule entière et montre les mêmes ISIs que dans les enregistrements en cellule attachée.

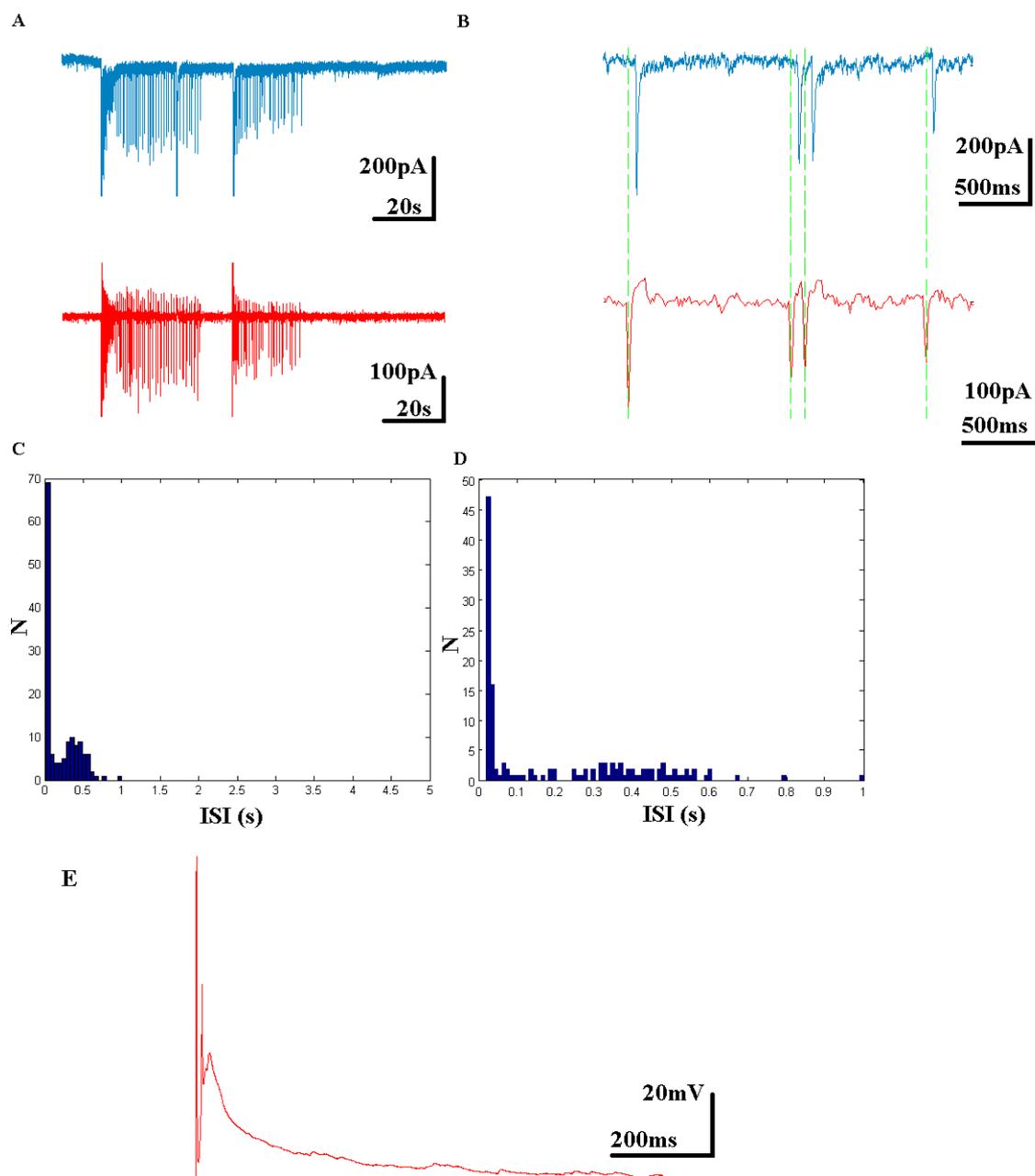


Figure III-22. Les neurones d'une paire isolée à deux semaines ont une activité sous forme de bouffée à basse voire très basse fréquence (16DIV). A. La cellule 1 est enregistrée en voltage clamp (trace bleue) et la cellule 2 en configuration cellule attachée (neurone 2, trace rouge). La cellule 2 fait spontanément deux bouffées successives de potentiels d'action et nous enregistrons les courants synaptiques reçus par la cellule 1. **B.** Détail de la première bouffée de potentiels d'action engendrée par la cellule 2 (trace rouge) et des courants synaptiques reçus par la cellule 1 (trace bleue). Les courants synaptiques arrivent dans la cellule 1 dans un délai de 5ms après chaque potentiel d'action de la cellule 2. **C et D.** La distribution des ISIs de la cellule 2 est calculée avec une fenêtre de 50ms et représentée pour des intervalles compris entre 0 et 5s dans l'histogramme C, et avec une fenêtre de 10ms et restreint aux intervalles compris entre 0 et 1s dans l'histogramme D. Dans un but de comparaison, l'histogramme C reprend la même mise en forme que les histogrammes donnés pour les autapses. L'histogramme D permet de voir plus finement la répartition des ISIs qui sont tous inférieurs à 1s. **E.** Réponse de la cellule 1 après évocation d'un potentiel d'action par un bref courant dépolarisant en courant imposé.

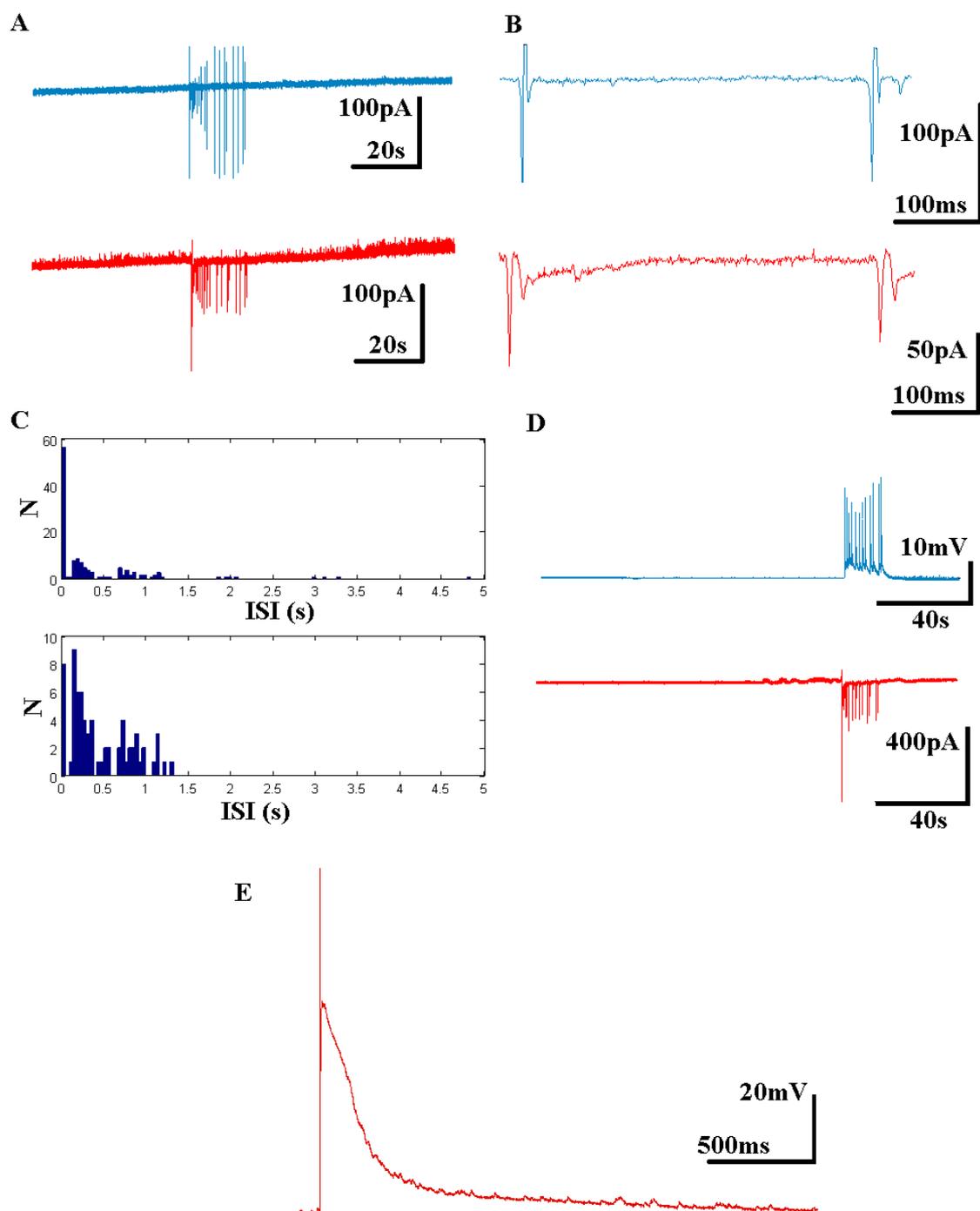


Figure III-23. Les neurones d'une paire isolée à trois semaines ont une activité sous forme de bouffée à très basse fréquence (23DIV). A. Les deux cellules (1 et 2, traces bleue et rouge respectivement) sont enregistrées en configuration cellule attachée et font une bouffée de potentiels d'action synchrones. **B.** Détail de la bouffée de potentiels d'action. **C.** Distribution des ISIs des deux cellules avec une fenêtre de 50ms (cellule 1 en haut, 2 en bas). **D.** Après passage de la cellule 1 en configuration cellule entière l'activité spontanée persiste en mode courant imposé. **E.** La réponse de la cellule 2 à un créneau de courant en configuration cellule entière montre un grand EPSP et une composante synaptique très lente chez les cellules matures.

Pour déterminer si la libération asynchrone est impliquée dans la persistance de l'activité des paires, nous avons analysé comment l'activité spontanée de paires était modifiée par une incubation des cellules en EGTA AM (15 minutes, à 50 μ M). L'incubation de paires de cellules âgées entre 3 et 4 semaines avec l'EGTA AM a conduit à une diminution de la durée des bouffées (830ms \pm 250ms, (n=4) , voir Fig. IV-26A et 26C). Ces résultats suggèrent que dans les paires comme pour les autapses glutamatergiques matures, la libération asynchrone de neurotransmetteurs joue un rôle dans la maintenance de l'activité.

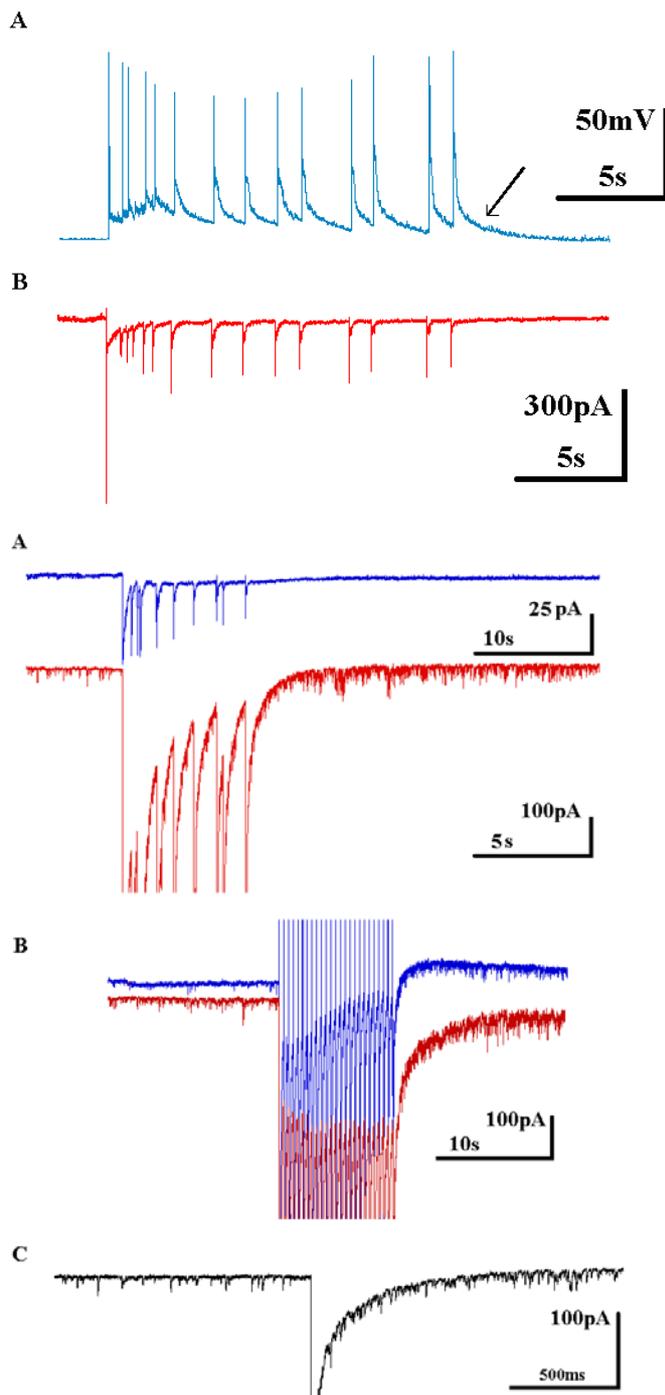


Figure III-25. La réponse synaptique lente, composée d'une composante discrète (libération asynchrone de glutamate) et d'une composante continue, est aussi observée dans les hétérosynapses d'une paire dès 14 DIV. A. Courants spontanés enregistrés dans la cellule 2 en voltage imposé (trace rouge) pendant que l'autre cellule de la paire (cellule 1, trace bleue) fait une bouffée de potentiels d'action spontanés. Le bruit synaptique après le train est nettement augmenté par rapport au repos. **B,** deux cellules sont enregistrées en potentiel imposé. Après évocation d'un train de 25 potentiels d'action à 4Hz dans la cellule 1, on observe une grande augmentation de la libération asynchrone dans les cellules 1 et 2 mise en évidence par l'augmentation du bruit synaptique sur chacune de traces. **C,** on observe l'augmentation de la fréquence des événements de libération après seulement un potentiel d'action de la cellule évoquée dans la cellule 2.

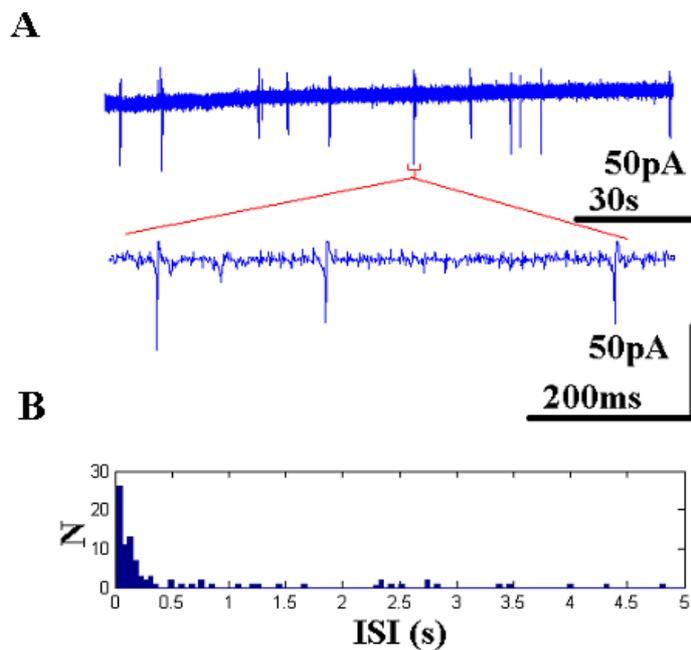


Figure III-26. L'incubation des cellules en l'EGTA AM qui supprime la composante lente (continue et discrète) se traduit par une disparition des intervalles longs au niveau de l'activité spontanée des cellules d'une paire (18 DIV). A. Enregistrement en configuration cellule attachée. B. Distribution des ISIs.

III.3. Dans les réseaux pluricellulaires

Une fois initiée dans un réseau multicellulaire, l'activité électrique peut *a priori* se maintenir grâce à deux types de mécanismes: des composantes synaptiques lentes comme dans le cas des réseaux hyper-synchrones (autapses et paires), des boucles d'activation récurrente. Nous allons estimer si les deux phénomènes contribuent au maintien de l'activité dans le réseau.

L'observation de temps longs (200ms-1s) pendant lesquels tous les neurones d'un réseau fermé sont silencieux (Fig. III-27) suggère que les composantes synaptiques lentes que nous avons décrites pour les autapses pourraient être mises en jeu aussi dans le cas des réseaux de neurones excitateurs. La résolution temporelle de l'imagerie calcique (50ms) ne permet pas de mettre en évidence les chaînes d'activation successives des neurones. En revanche, on peut voir sur de nombreux exemples que l'activité peut se maintenir dans une bouffée au niveau de certains neurones seulement puis être redistribuée au reste du réseau (voir Fig.III-28).

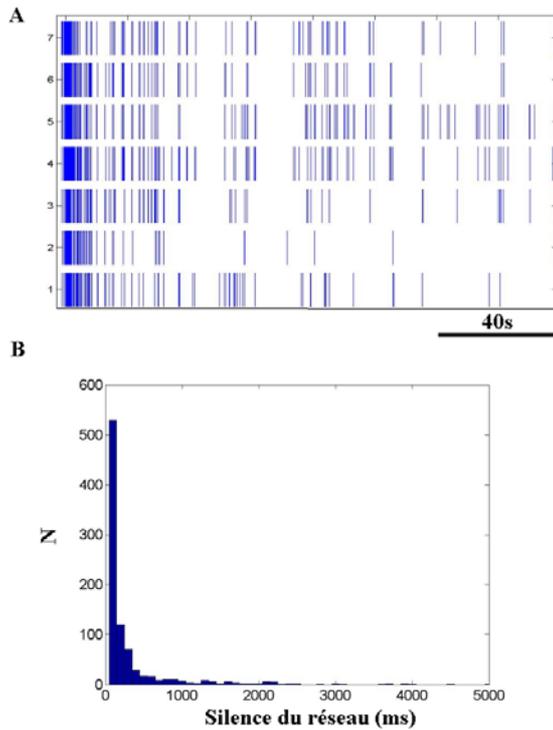


Figure III-27. Les neurones montrent de longs silences dans les bouffées de potentiels d'action collectives. A. Le raster plot d'une bouffée de potentiels d'action pour un réseau de 7 neurones montre que chaque neurone peut être silencieux pendant plusieurs secondes dans une bouffée. **B.** La distribution des durées des silences *communs à l'ensemble des neurones du réseau* montre qu'il existe des silences de 1 à 2 seconde(s) dans une bouffée.

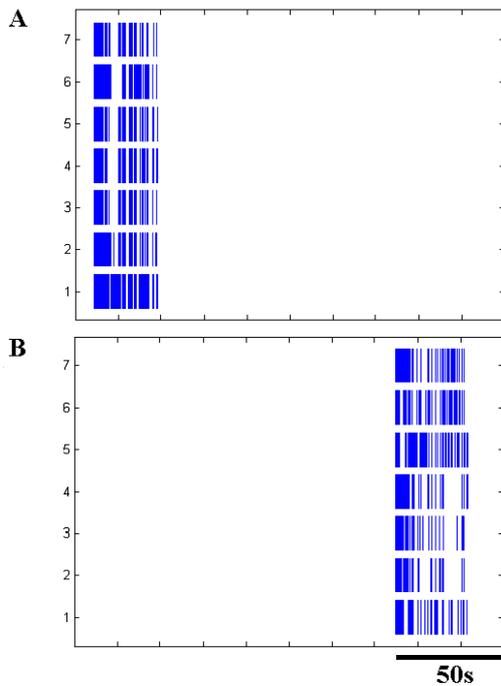


Figure III-28. Maintien de l'activité spontanée dans des réseaux excitateurs grâce à des mécanismes de réseau : rétention et redistribution. Raster plots montrant des bouffées de potentiels d'action où certains neurones restent silencieux pendant environ 5 secondes alors que d'autres neurones maintiennent l'activité, puis la redistribuent. **A.** Dans ce réseau, seul le neurone 1 reste actif pendant que tout le reste du réseau est silencieux. **B.** Dans ce réseau, les neurones 1, 5, 6 et 7 déchargent pendant que le reste du réseau est silencieux.

Conclusion

Dans les réseaux ultra-synchrones (autapses et paires de neurones isolées), la persistance de l'activité à très basse fréquence dans une bouffée fait intervenir la composante synaptique de type NMDA seul ou associé à une composante très lente dépendant du calcium résiduel. Cette réponse synaptique lente est composée d'une fraction discrète (libération asynchrone de glutamate) et d'une partie continue provenant de l'activation d'une conductance post-synaptique⁵, vraisemblablement le courant I CAN mis en évidence dans l'hippocampe (Congar et al., 1997).

Dans les réseaux pluricellulaires, la persistance de l'activité dans une longue bouffée collective pouvait reposer sur l'activité de quelques neurones pendant que le reste du réseau est silencieux. La composante synaptique lente dépendant du calcium résiduel pourrait maintenir l'activité à basse fréquence au sein de ces petites assemblées (voir schéma de synthèse de l'initiation et de la maintenance, Fig. III-29).

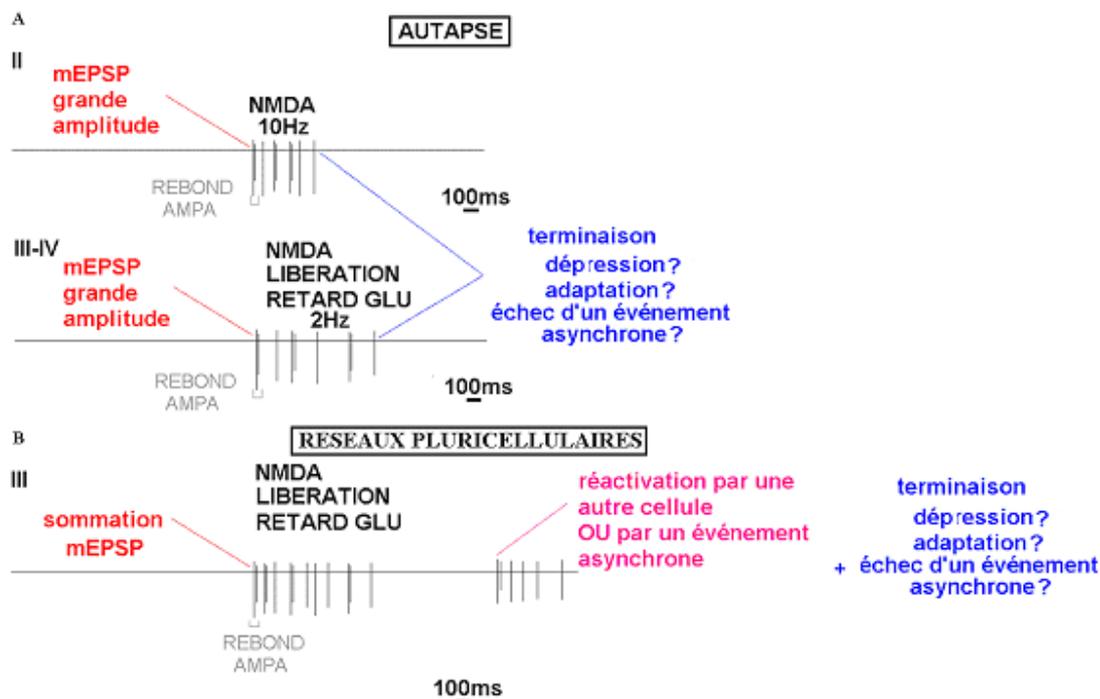


Figure III-29. Proposition d'un schéma de synthèse de l'initiation et de la maintenance de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs. **A.** Pour une autapse, modèle de réseau excitateur ultra-synchrone. L'initiation d'une bouffée a lieu grâce à des événements miniatures de grande amplitude. Après un premier potentiel d'action, la cellule peut former un potentiel d'action rebond sur la composante AMPA de l'EPSP puis maintient une activité à basse fréquence pendant plusieurs secondes. Les récepteurs du glutamate de type NMDA seul et associé à une composante dépendant du calcium résiduel permettent le maintien de l'activité respectivement à basse et très basse fréquence. La terminaison pourrait être due à la dépression synaptique, à l'adaptation calcium dépendante. **B.** Pour les réseaux pluricellulaires, deux points différents : *i*) la libération spontanée de glutamate permet l'initiation d'une bouffée vraisemblablement par sommation de mEPSPs qui ont lieu à plus haute fréquence que dans l'autapse ; *ii*) l'activité se maintient aussi grâce à des mécanismes de réseaux.

⁵ sensible à l'addition de l'antagoniste MCPG des récepteurs métabotropiques de type 1 et 5 et de la nifédipine

IV. STRUCTURE FONCTIONNELLE DES RESEAUX ET DYNAMIQUE DE L'ACTIVITE SPONTANEE

Objectifs

La structure fonctionnelle d'un réseau peut être définie par la nature des neurones, leur propriétés cellulaires et les connexions qui les lient. J'ai analysé la dynamique de l'activité spontanée dans des réseaux ayant différentes architectures dans le but de préciser les relations entre la *structure fonctionnelle* d'un réseau neuronal et la *dynamique* de l'activité spontanée qu'il génère.

Je vais montrer en quoi l'architecture contrôlée par lithographie détermine certains paramètres de la structure fonctionnelle des réseaux. Nous verrons que les réseaux excitateurs d'architecture contrôlée peuvent être assimilés à des autapses connectées entre elles avec une probabilité décroissante avec la distance. La distance entre neurones dans le réseau est associée à une probabilité de contacts synaptiques qui décroît avec elle. Ainsi la structure fonctionnelle de nos réseaux d'architecture contrôlée peut être ramenée⁶ *i)* au nombre total de neurones, *ii)* à la nature (GABAergique ou glutamatergique) des neurones et *iii)* à leur position relative, correspondant à une probabilité de connectivité.

J'ai considéré les effets de ces paramètres sur la dynamique de l'activité spontanée caractérisée par *i)* les profils de décharge et le niveau d'activité des neurones individuels ; *ii)* à l'échelle du réseau, le nombre d'états d'activation possibles, le niveau de synchronisation moyen et l'émergence d'assemblées de neurones synchrones.

Méthodologie

Mesure de l'activité spontanée des réseaux de neurones d'architecture contrôlée

Notre étude des réseaux de neurones repose principalement sur la mesure des variations de concentration du calcium intracellulaire en imagerie de fluorescence avec la sonde Fura 2 AM (voir Chapitre II, (Peterlin et al., 2000)). Cette mesure, effectuée simultanément sur tous les corps cellulaires des neurones d'un réseau, permet d'estimer le temps d'arrivée des potentiels d'action de tous les neurones avec une résolution temporelle de 50ms et une

⁶ En omettant des propriétés cellulaires des neurones sur lequel nous n'avons aucun contrôle.

fiabilité d'environ 95% (voir Chapitre II). L'activité peut être suivie sur une durée allant jusqu'à 2500s sans toxicité neuronale. Cette technique comporte l'avantage que le milieu intracellulaire n'est pas dialysé, mais pourrait modifier l'homéostasie du calcium intracellulaire. Nous avons vérifié que la liaison du calcium par la sonde Fura 2 ne modifiait pas la dynamique de l'activité spontanée en comparant les distributions d'ISIs supérieures à 50ms obtenue en imagerie calcique et en patch clamp (configuration cellule attachée) pour autapses et paires de neurones.

Détermination de la nature des neurones

Nous ne disposons pas de moyens pour identifier les neurones GABAergiques et glutamatergiques *a priori* dans notre système. Les critères morphologiques utilisés en culture standard (ramification des dendrites, polarité de la cellule) ne sont pas applicables dans les réseaux où la morphologie des neurites est influencée par le motif d'adhésion. La nature des neurones a donc été déterminée *a posteriori* par un double marquage anti GAD-65 et anti GABA (voir Chapitre II). Dans le cas des paires, nous avons étudié l'activité spontanée en double patch clamp. Pour identifier le type des neurones, nous avons analysé la nature des EPSC autaptiques après le passage en configuration cellule entière. Le couplage de l'approche d'immunocytochimie aux enregistrements en imagerie calcique nécessite de retrouver un réseau sur une lamelle de verre qui en comporte un millier. Cette étape étant assez lourde, nous avons limité notre étude à 27 réseaux âgés de 18 à 20 jours. Le manque de critères d'identification des neurones inhibiteurs a pour conséquence que les réseaux ont été étudiés sans sélection préalable. Or nous avons vu dans le chapitre 1 que la proportion de neurones inhibiteurs dans notre système de culture peut varier entre 10 et 25%. Statistiquement la probabilité d'étudier un réseau purement excitateur diminue avec le nombre total de neurones. En conséquence, l'étude des réseaux purement excitateurs s'est restreinte à des réseaux comportant au maximum 10 neurones. Rappelons qu'à trois semaines, le GABA n'est plus dépolarisant dans notre système comme dans des préparations corticales (Voigt et al., 2001; Opitz et al., 2002). Nous qualifierons ainsi les cellules GABAergiques de cellules inhibitrices dans le reste de ce chapitre.

IV.1. Définition de la structure fonctionnelle d'un réseau de neurones d'architecture contrôlée

Trois paramètres de l'architecture d'un réseau vont définir sa structure fonctionnelle : le nombre total de neurones, la nature de chaque neurone et la probabilité de connectivité entre neurones.

IV.1.1. Nombre total de neurones

Les réseaux de neurones d'architecture contrôlée sont fermés : ils sont constitués d'un nombre fixe de neurones depuis le début de leur incubation *in vitro* jusqu'au moment de l'expérience. Le nombre de neurones total constitue donc un paramètre de la structure. Il varie entre 1 et 20 dans les réseaux étudiés.

IV.1.2. Nature des neurones

La nature glutamatergique / GABAergique de chaque neurone déterminée par l'immunocytochimie ou le patch clamp est aussi un paramètre immuable pour un réseau donné. Les neurones inhibiteurs constituent entre 10 et 20% de tous les neurones dans nos cultures. Dans notre étude, leur nombre au sein d'un réseau a varié entre 0 et 4 et la balance inhibition / excitation entre 0 et 0,2.

IV.1.3. Connectivité et géométrie

Sachant que les neurones forment des synapses matures après une semaine *in vitro*, j'ai évalué si leur formation était orientée par la géométrie du réseau. Puisque notre protocole ne favorise pas dans les voies entre domaines par exemple la croissance des dendrites par rapport à celle des axones et ne restreint pas la croissance des neurites sur le motif de poly-lysine, il n'était pas évident que la connectivité entre neurones soit corrélée avec la géométrie. Dans le but d'évaluer la connectivité en fonction de la distance, j'ai fabriqué des masques en étoile à 6 branches⁷ avec l'idée qu'un neurone au centre (avec *a priori* le plus de neurones voisins) est fortement connecté aux autres, tandis qu'un neurone en périphérie (avec moins de neurones partenaires dans un voisinage proche) est peu connecté au reste du réseau.

⁷ Ce motif de réseau en étoile est celui que j'ai conservé pendant toutes mes expériences sur les réseaux.

La connectivité a été quantifiée entre paires de neurones excitateurs dans des réseaux de 5 à 10 neurones âgés entre 2 et 3 semaines⁸. Par une approche de double patch, j'ai testé s'il existait un lien entre la distance entre neurones excitateurs dans le réseau et l'observation d'une réponse monosynaptique entre eux. Une réponse monosynaptique est définie lorsque le courant excitateur post synaptique (EPSC, Excitatory Post-Synaptic Current) arrive après un délai court (inférieur à 10ms) et a un décrétement mono-exponentiel. Dans le cas où une réponse monosynaptique était enregistrée, j'ai mesuré son amplitude (voir Fig. IV-1).

Un neurone glutamatergique pris au hasard forme toujours des synapses sur lui-même (homosynapses ou autapses) et sur un autre neurone éventuellement placé sur le même disque (hétérosynapses); la probabilité de contacts mono-synaptiques entre neurones 1^{er} voisins est supérieure au double de celle entre neurones éloignés (90% et 40% respectivement, voir Fig. IV-2). L'amplitude de la réponse synaptique décroît également en fonction de la distance entre les neurones dans le réseau (Fig.IV-1) : les neurones proches ont une plus grande probabilité de former des synapses entre eux.

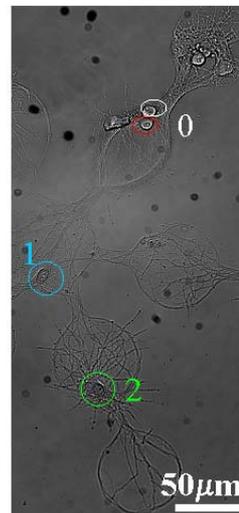
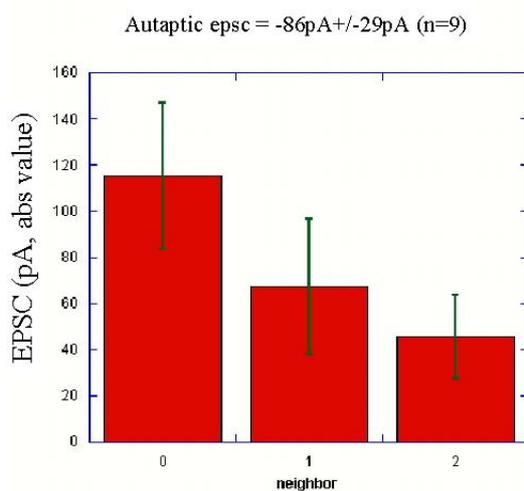


Figure IV-1. L'amplitude des EPSCs diminue avec la distance entre neurones dans un réseau d'architecture contrôlée âgé de 2 à 3 semaines. Un enregistrement en double voltage clamp est réalisé sur des paires de neurones d'un même réseau. Une cellule du disque 0 est stimulée par un bref créneau de potentiel dépolarisant. Si une cellule 0 forme des synapses excitatrices sur la cellule 1, la stimulation de la cellule 1 entraîne après un délai de l'ordre de 5-10 ms un EPSC sur la cellule 1. Sur l'histogramme, l'amplitude des EPSC a été moyennée entre différentes paires de neurones : pour les neurones du même disque (indiqué par 0, n=9), de disque premiers voisins (indiqué par 1, n=12) et seconds voisins (indiqué par 2, n=9). L'amplitude de l'EPSC, qui reflète le nombre de synapses glutamatergiques formées par un neurone sur l'autre, diminue avec la distance (amplitude moyenne d'un EPSC autaptique : 86pA +/- 29pA).

⁸ Une étude quantitative pour les neurones GABAergiques eut été laborieuse, car ils ne sont pas facilement reconnaissables *a priori* et constituent moins de 20% des cellules. Néanmoins sur quelques exemples, j'ai observé qu'ils formaient aussi des autapses de grande amplitude et étaient connectés fortement à leurs premiers voisins.

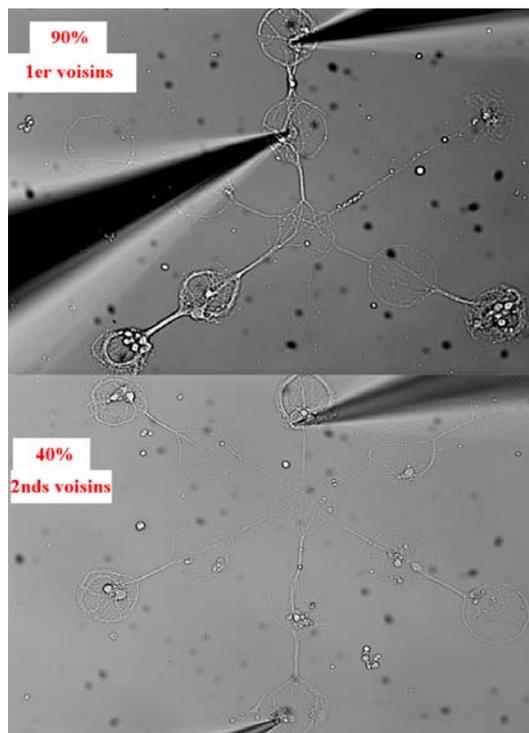


Figure IV-2. La distance entre neurones est associée à une probabilité de connexion mono-synaptique entre paires de neurones excitateurs dans un réseau d'architecture contrôlée entre 2 et 3 semaines. Les EPSCs provenant de contacts mono-synaptiques sont évalués à partir du délai court de l'EPSC (<10ms), de leur stabilité d'un essai à l'autre et de leur décroissance qui suit une loi exponentielle. La probabilité de connexion décroît avec la distance entre les neurones d'une paire. Cette distance ne correspond pas à une distance physique mais au nombre d'intermédiaires entre neurones.

Conclusion

Il existe donc un gradient de connectivité entre neurones excitateurs déterminé par la géométrie du réseau. L'architecture contrôlée par la lithographie détermine donc la structure fonctionnelle d'un réseau (schématisée Fig. IV-3) que l'on définit par le nombre total de neurones, la présence de neurones inhibiteurs et une probabilité de connectivité associée à la distance entre neurones. Bien sur, cette information est une moyenne statistique et peut donc rencontrer des exceptions, néanmoins nous verrons qu'elle peut être utile pour l'interprétation des données et la modélisation de l'activité des réseaux.

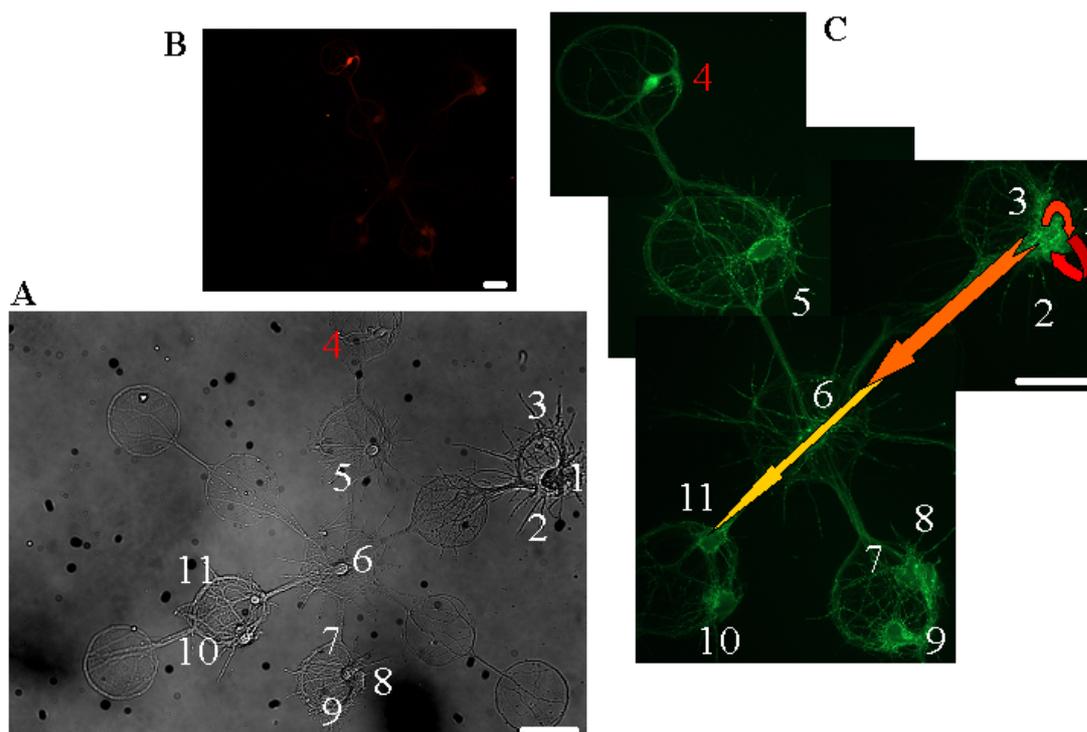


Figure IV-3. Structure fonctionnelle d'un réseau d'architecture contrôlée typique composé de 11 neurones avec une géométrie en étoile (20 DIV). A. Par imagerie optique (Differential Interference Contrast, DIC), le nombre total de neurones (11) et leur position respective est déterminée. B,C. *A posteriori*, par immunocytochimie (voir chapitre II) avec un anticorps dirigé contre le GABA (rouge, B) et la GAD 65 (vert, C), le nombre et la position des neurones inhibiteurs sont déterminés. Dans cet exemple, un seul neurone est inhibiteur : le neurone 4. Il forme des synapses GAD 65 positives sur l'ensemble des corps cellulaires des autres neurones du réseau. La probabilité de contacts synaptiques entre neurones dépend de la distance qui les sépare dans les réseaux à 3 semaines. Cette probabilité de connexion P_c est schématisée par les flèches sur la figure C pour le neurone numéroté 1. P_c est maximale (flèche rouge) pour les synapses sur le neurone même (autapses) et les synapses sur les neurones du même disque (neurones 2 et 3). P_c décroît pour les neurones premiers voisins (neurone 6, flèche orange) et seconds voisins (neurones 11, 10, 7, 8, 9 et 5, flèche jaune représentée vers le neurone 11). La barre d'échelle représente toujours $50\mu\text{m}$.

Nous allons désormais considérer l'influence de ces 3 paramètres de structure sur la dynamique de l'activité spontanée individuelle et collective des neurones excitateurs du réseau.

IV.2. Propriétés individuelles des neurones excitateurs

IV.2.1. Profils de décharge des neurones

IV.2.1.1. La décharge des neurones est similaire dans tous les réseaux excitateurs

Les neurones des réseaux excitateurs (autapses, paires isolées, triplets et réseaux composés d'une dizaine de neurones) déchargent des bouffées de potentiels d'action séparées par des silences (autapses Fig. III-2, paires Fig. III-3, réseaux Fig. III-4 et Fig. III-5 et bilan Fig. IV-4). Dans les réseaux pluricellulaires, les distributions des ISIs établies à partir de l'imagerie calcique sont globalement similaires à ce que nous avons décrit pour les autapses excitatrices (chapitre III): la plupart des intervalles sont compris entre 50 et 100ms et sont quasiment tous inférieurs à 500ms (Fig. IV-5). Les enregistrements électrophysiologiques confirment ces observations et révèlent que les neurones en réseaux ne déchargent pas de façon soutenue à des fréquences plus élevées⁹. Les neurones des réseaux excitateurs génèrent, indépendamment du nombre de neurones dans le réseau, des bouffées de potentiels d'action correspondant comme pour l'autapse à un état d'activité stable et auto entretenu. Dans ces bouffées, les neurones déchargent dans une même gamme de fréquence indépendamment du nombre de neurones total.

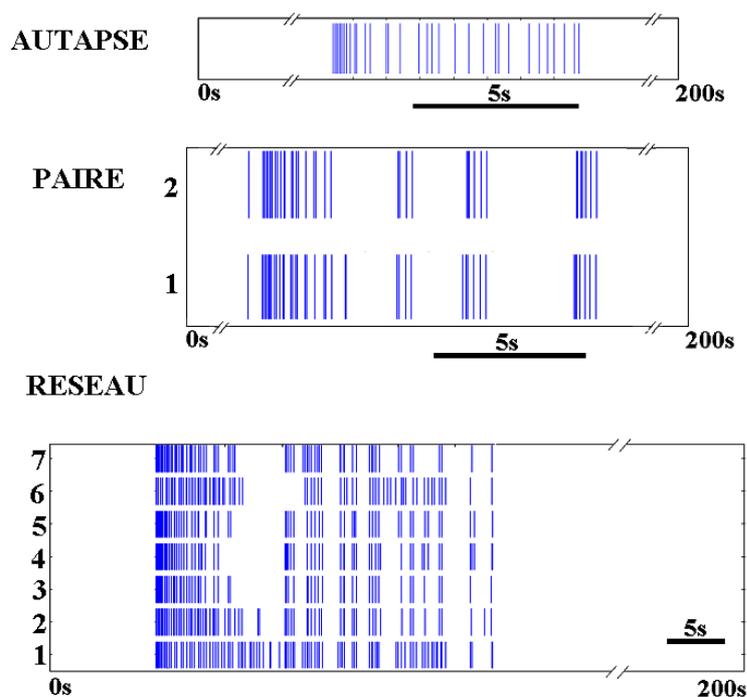


Figure IV-4. Les profils de décharge du type bouffée et silence sont communs à tous les neurones des réseaux excitateurs à 3 semaines. Raster Plot obtenu à partir de l'imagerie calcique pour une autapse (haut), les neurones d'une paire isolée (milieu), les neurones d'un réseau de 7 neurones (bas). Noter l'apparition de silences très longs au sein d'une bouffée dans les réseaux avec pluricellulaires.

⁹ Les fréquences supérieures à la fréquence d'acquisition des images (20Hz) ne peuvent pas être observées en imagerie calcique vu la fréquence d'acquisition de notre système d'imagerie.

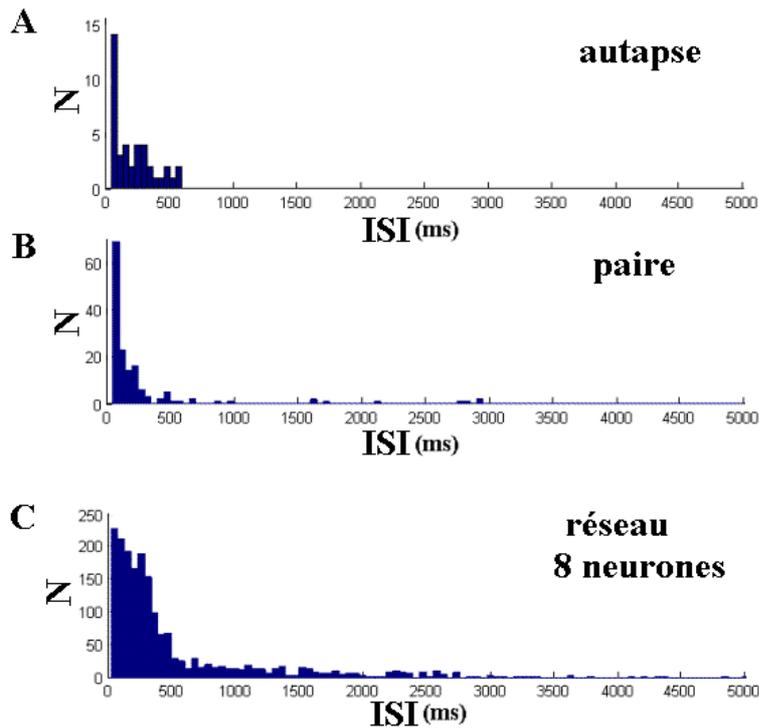


Figure IV-5. Distributions des intervalles de temps entre potentiels d'action (ISIs) estimées par imagerie calcique en fonction du nombre de neurones dans le réseau (20DIV). A. Distribution pour une autapse. B. Pour une paire. C. Pour un réseau de 8 neurones. Dans les réseaux excitateurs de grande taille, beaucoup d'ISIs sont supérieurs à une seconde ce qui reflète l'apparition de longs silences au sein d'une bouffée de potentiels d'action (voir Fig. IV-4). Les distributions ne sont pas normalisées (N est le nombre d'événements observés).

IV.2.1.2. Effet du nombre total de neurones sur la décharge des neurones excitateurs

Nous avons vu qu'indépendamment du nombre de neurones dans un réseau excitateur, les neurones ont le même type de décharge (bouffées séparées par de longs silences). Néanmoins il existe des différences au niveau de la distribution des intervalles de temps entre potentiels d'action (ISIs) au sein d'une bouffée. Les ISIs des paires, comme ceux des autapses matures, sont compris entre 50 et 100ms et s'étalent jusqu'à 1 seconde (Fig. IV-5B). Dans les réseaux excitateurs de 7-8 neurones, la distribution des ISIs a un pic large entre 50ms et 500ms et atteignent 2,5s (voir Fig. IV-5C) ce qui montre la présence de silences exceptionnellement longs dans une bouffée pour certains neurones excitateurs (voir les neurones 2, 3,4 dans l'activité du réseau excitateur représentée Fig. IV-4).

IV.2.1.3. Diversification des profils de décharge dans les réseaux avec un neurone inhibiteur

Dans les réseaux avec un neurone inhibiteur au moins, les cellules excitatrices ne font plus seulement des bouffées mais aussi des potentiels d'action isolés (voir le neurone 12 dans la Fig. IV-6B, les neurones 2 et 3 Fig. IV-7A, les neurones 3,4,6,7 Fig. IV-8A, neurone 2 de Fig. IV-9A1 et neurones 2,3,4 Fig. IV-9B1). L'action des neurones inhibiteurs est confirmée par l'application de bicuculline methiodide (1 μ M) qui entraîne l'apparition de bouffées massives de potentiels d'action (Fig. IV-10). Les neurones du réseau passent d'une

dynamique complexe où bouffées et potentiels d'actions isolés s'alternent à une dynamique de bouffées / silences similaire à celle des réseaux purement excitateurs (Fig. IV-10)¹⁰.

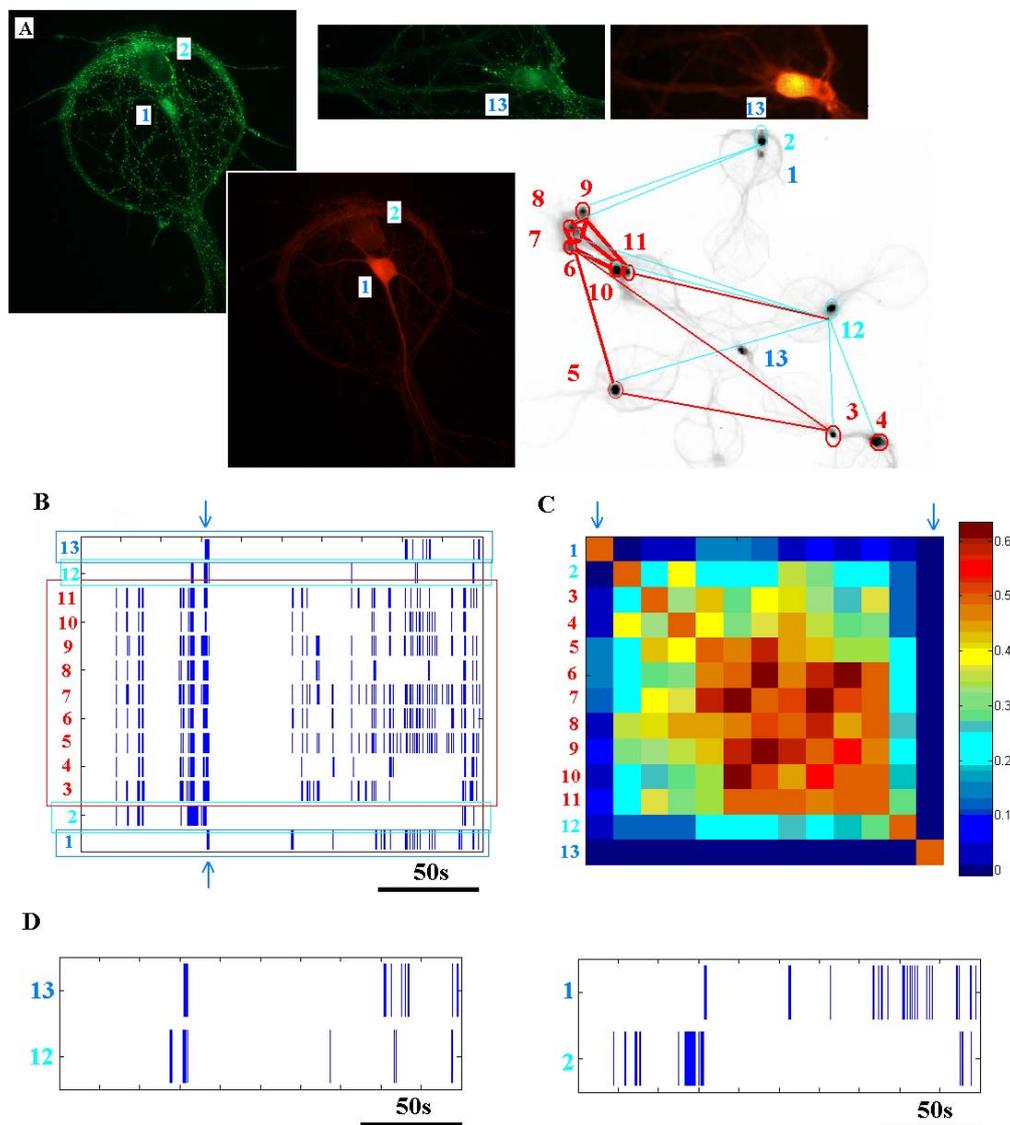


Figure IV-6. La dynamique de l'activité spontanée d'un réseau qui comporte des neurones inhibiteurs montre une diversification des profils de décharge et la ségrégation d'assemblées de neurones synchrones. **A.** Dans un réseau de 13 neurones après 18 DIV, deux neurones exprimant la GAD (vert) et le GABA (rouge) sont inhibiteurs et numérotés 1 et 13. Un négatif de l'image de fluorescence du Fura 2 montre que le neurone 1 est en bout de branche (premier voisin : 2) et que le neurone 13 est au centre (premiers voisins : 12, 3 et 5). **B.** Raster plot à partir d'un enregistrement de 200s. Les neurones inhibiteurs 1 et 13 sont silencieux pendant plus de 100s ; lors de la bouffée collective, ils ne sont activés qu'en fin de bouffée (flèches bleues). **C.** Carte de corrélation calculée pour $t = 0$ (voir définition page 111, et Fig. IV-17). Les colonnes des neurones inhibiteurs sont notées d'une flèche bleue : leur activité est peu corrélée avec le reste du réseau ($C < 0.1$). En revanche, les coefficients de corrélation sont élevés entre les neurones du groupe 6-11 ($C > 0.5$). Les neurones premiers voisins de 1 et 13 numérotés 2 et 12 ont une situation intermédiaire ($0.1 < C < 0.3$). Les valeurs des corrélations les plus importantes sont représentées par l'épaisseur des traits entre paires sur le négatif de l'image de fluorescence représentée en A. **D.** Grossissement sur les potentiels d'action émis par 1 et 13 et leurs premiers voisins, 2 et 12.

¹⁰ L'activité dans un réseau comprenant un neurone inhibiteur au moins est différente de celle observée dans un réseau purement excitateur dans le sens où certaines cellules continuent à décharger des potentiels isolés dans un réseau avec des neurones GABAergiques en présence de bicuculline (Fig. IV-10).

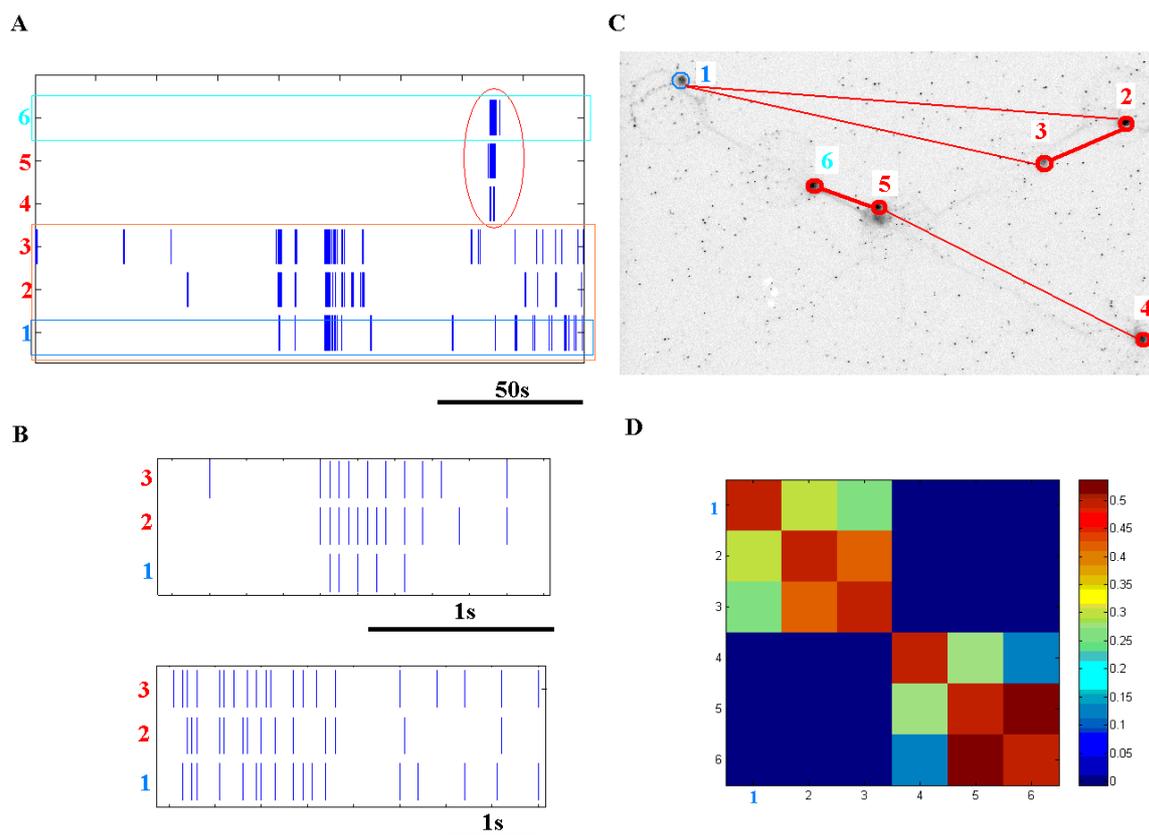


Figure IV-7. La dynamique de l'activité spontanée d'un réseau qui comporte un neurone inhibiteur montre certaines spécificités : la diversification des profils de décharge et des états d'activation, la ségrégation d'assemblées de neurones synchrones. Réseau de six neurones dont un inhibiteur (le neurone 1) à 21 DIV. **A.** Raster plots montrant l'activation de sous ensembles dans le réseau à 21 DIV : les triplets constitués par les neurones 1,2,3 et 4,5,6 s'activent de façon alternée. **B.** Le détail de l'activation du triplet constitué par les neurones 1,2,3 lors de deux bouffées successives montre que le neurone 1 est activé en retard par rapport à 2 et 3. **C.** Le négatif de l'image de fluorescence montre que le neurone inhibiteur 1 est très excentré du reste du réseau. Il ne forme pas une assemblée avec ses voisins mais avec les neurones 2 et 3 sur une autre branche. **D.** La carte de corrélation à $t = 0$ des neurones du réseau (voir définition page 111, et Fig. IV-17) montre très nettement la présence de deux assemblées indépendantes dans le réseau.

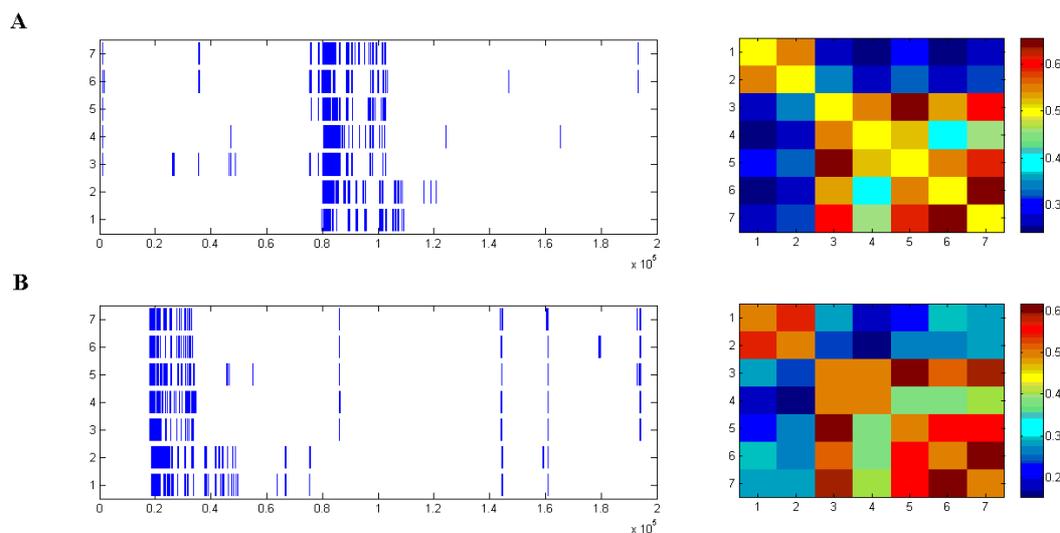


Figure IV-8. Activité dans un réseau composé de 7 neurones avec un neurone inhibiteur (neurone 1) à 22DIV. **A et B à gauche.** Raster plots montrant une bouffée collective et des potentiels d'action isolés pour deux enregistrements successifs de 200s. La carte de corrélation à $t=0$ calculée à chaque fois figure à droite (voir définition page 111, et Fig. IV-17). La bonne correspondance entre les deux cartes montre que la carte de corrélation à $t = 0$ calculé sur un enregistrement de 200s est reproductible pour un même réseau.

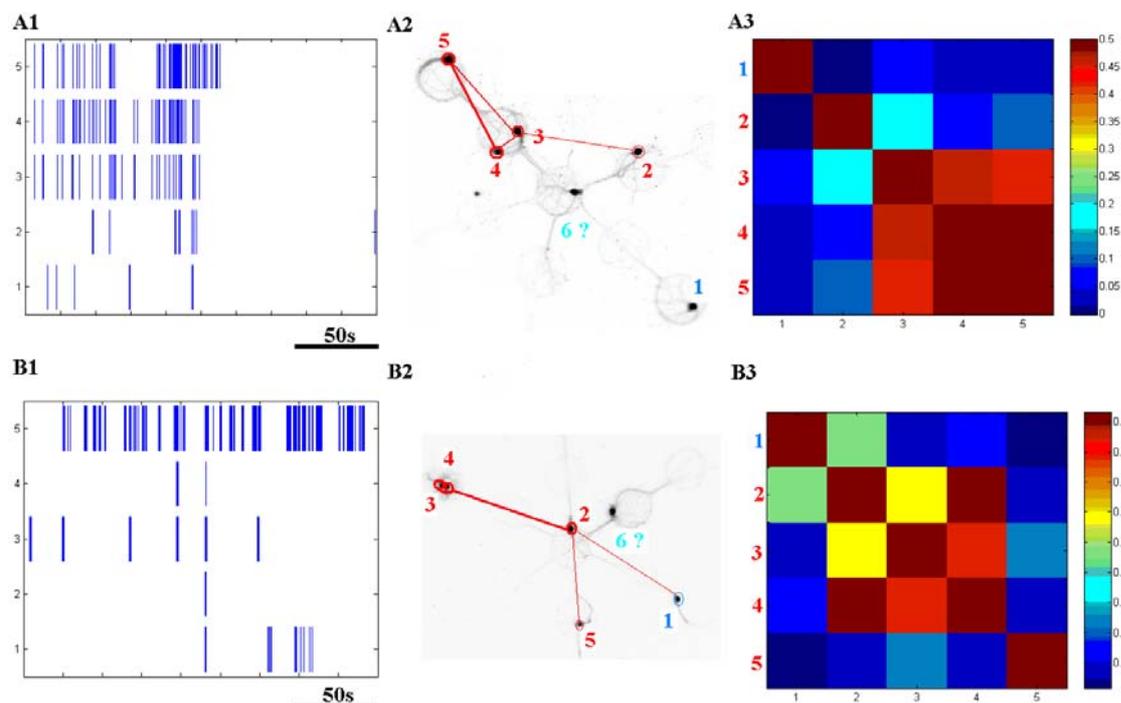


Figure IV-9. L'activité spontanée de réseaux à 18 DIV avec 5 neurones actifs dont un inhibiteur montre beaucoup de potentiels d'action isolés et peu de corrélation entre neurones. A1 et B1. L'activité de chaque réseau sur 200s est représentée sous forme de Raster Plots. **A2 et B2.** Le négatif de l'image de fluorescence montre que dans les deux cas le neurone inhibiteur (neurone 1) a une position excentrée. **A3 et B3.** Les cartes de corrélation d'activité entre paires de neurones (voir définition page 111, et Fig. IV-17) montrent l'apparition d'assemblées de neurones synchrones : dans le 1^{er} réseau, le triplet (3, 4 et 5) et dans le 2^{ème} réseau, le triplet (2,3 et 4). Le neurone excitateur (noté 6) voisin du neurone inhibiteur est silencieux pendant tout l'enregistrement.

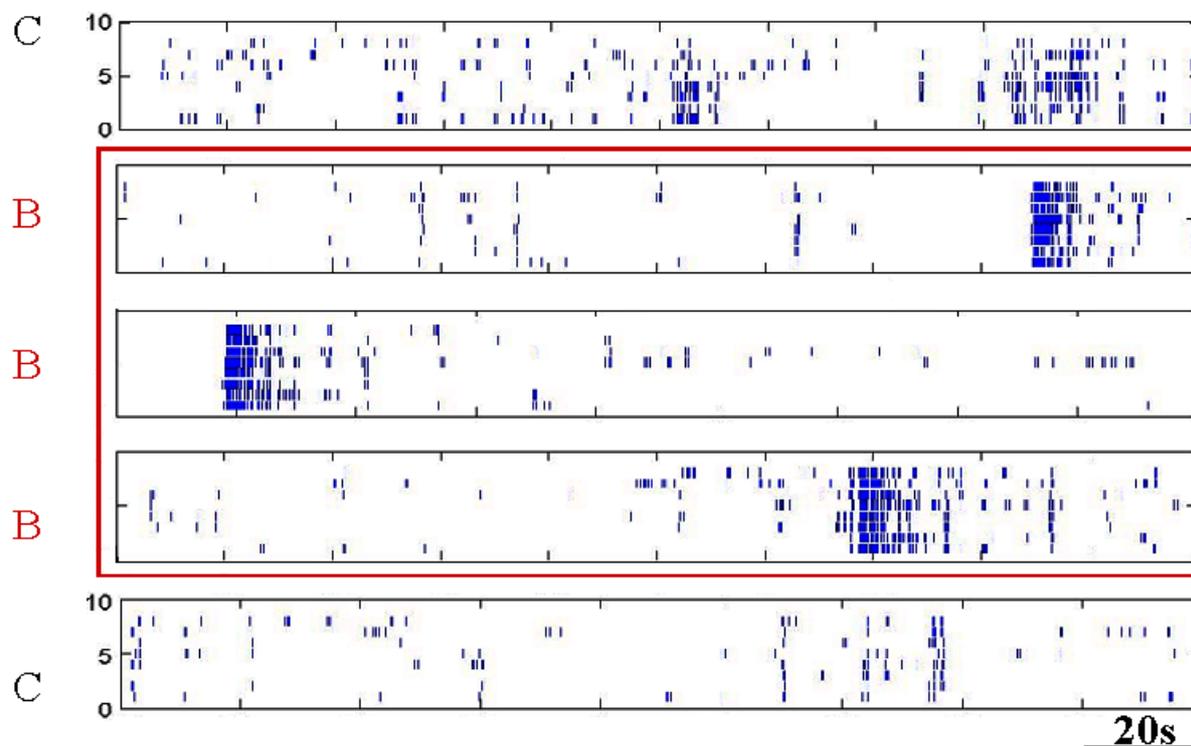


Figure IV-10. Dans un réseau de 9 cellules avec plusieurs neurones inhibiteurs, la bicuculline modifie le profil de décharge des neurones entraînant l'apparition de bouffées de potentiels d'action et de silences. Raster plots montrant l'activité spontanée avant (C), pendant (B) et après (C) l'application de bicuculline.

IV.2.2. Niveau d'activité des neurones

Nous avons estimé le niveau d'activité des neurones par le nombre total de potentiels d'action émis dans une fenêtre de 200s. Cette estimation est assez grossière car elle ne tient pas compte de la durée des silences et du nombre de bouffées de potentiels d'action dans la fenêtre considérée.

IV.2.2.1. Croissant avec le nombre de neurones dans les réseaux excitateurs

Nous comparons le nombre moyen de potentiels d'action émis par un neurone en fonction du nombre total de neurones dans un réseau purement excitateur. Ce nombre passe de 1 toutes les 10 secondes dans les autapses et les paires à 1 toutes les 2,5 secondes dans les réseaux de 7 à 8 neurones. Le niveau d'activité augmente donc avec le nombre de neurones dans le réseau purement excitateur.

IV.2.2.2. Activité modérée des neurones excitateurs voisins du neurone inhibiteur

Les neurones excitateurs voisins des inhibiteurs dans le réseau émettent moins de potentiels d'action que les neurones éloignés dans les mêmes réseaux ou que dans les neurones des réseaux excitateurs. Ils font en moyenne 2,7 potentiels d'action toutes les dix secondes ($n=10$). Ils ont donc un niveau de décharge intermédiaire entre les inhibiteurs (2,1 potentiels d'action toutes les dix secondes) et les excitateurs (4,1 potentiels d'action toutes les dix secondes) des mêmes réseaux. Dans certains cas, les premiers voisins des neurones inhibiteurs sont même restés silencieux pendant toute l'acquisition qui dure au moins 200s (neurone 6 Fig. IV-9A1 et Fig. IV-9B1).

Considérons l'exemple du réseau représenté dans la figure IV-6. Les neurones 1 et 13 sont inhibiteurs et les neurones 2 et 12 leurs premiers voisins respectifs (Fig. IV-6A). Les neurones 2 et 12 montrent de grands silences alors que les autres neurones excitateurs du réseau s'activent. Leur activité est souvent alternée dans le temps avec celle de leur voisin inhibiteur (voir l'activité de chaque neurone inhibiteur et de son voisin, Fig. IV-6D). Ces neurones ne s'activent pas systématiquement lorsqu'une bouffée collective est initiée (voir la première bouffée, Fig. IV-6B) ou bien s'activent en retard (voir la deuxième bouffée, Fig. IV-6B) alors que les neurones inhibiteurs ne sont apparemment pas actifs. Cette observation a

plusieurs interprétations¹¹ qui demandent des expériences en Patch Clamp supplémentaires (voir discussion perspective de ce manuscrit).

IV.2.2.3. Pas de modération de l'activation globale des neurones excitateurs distants du neurone inhibiteur

L'action des neurones inhibiteurs de modération de l'excitation ne concerne pas l'ensemble du réseau. En effet, l'activité moyenne des neurones excitateurs des réseaux excitateurs avec un neurone inhibiteur au moins est même plus élevée que dans les réseaux excitateurs que nous avons précédemment étudiés (avec inhibiteur : 4 potentiels d'action émis toutes les 10s ; sans inhibiteur : 3 potentiels d'action toutes les 10s).

Conclusion

Le niveau d'activité des neurones excitateurs croît avec le nombre de neurones dans le réseau. Les neurones inhibiteurs dans les réseaux d'architecture contrôlée restreignent localement l'excitation des neurones voisins, mais ne diminuent pas le niveau d'activité des neurones excitateurs distants.

IV.2.3. Durée des bouffées de potentiels d'action collectives

IV.2.3.1. Croissante avec le nombre de neurones excitateurs

Pour les autapses excitatrices, la durée des bouffées est comprise entre 2s et 15s (n=17). Chez les paires, les bouffées durent entre 7s et 40s (n=9). Dans les réseaux comprenant 7 à 8 neurones excitateurs, les bouffées se maintiennent entre 30s et 160s (n=5). La durée des bouffées à 3 semaines augmente donc avec le nombre de neurones du réseau excitateur.

IV.2.3.2. Effets variables des neurones inhibiteurs

L'application de bicuculline methiodide (1 μ M) a des effets variables sur la durée des bouffées (Fig. IV-12). Selon les réseaux, la bicuculline peut provoquer l'apparition de bouffées plus courtes (Fig. IV-11A1, Fig. IV-11A2, Fig. IV-12A) ou plus longues (Fig. IV-12B). Les effets antagonistes de la bicuculline sur la durée des bouffées collectives montrent

¹¹ Soit les neurones voisins des inhibiteurs ne sont pas connectés autant que les autres neurones excitateurs dans le réseau, soit les inhibiteurs modèrent l'activité de leur voisin excitateur sans forcément émettre de potentiels d'action. Ils pourraient agir par la libération spontanée de GABA ou via des jonctions GAP.

la diversité des rôles des neurones inhibiteurs sur la persistance de l'activité des neurones excitateurs et la terminaison d'une bouffée.

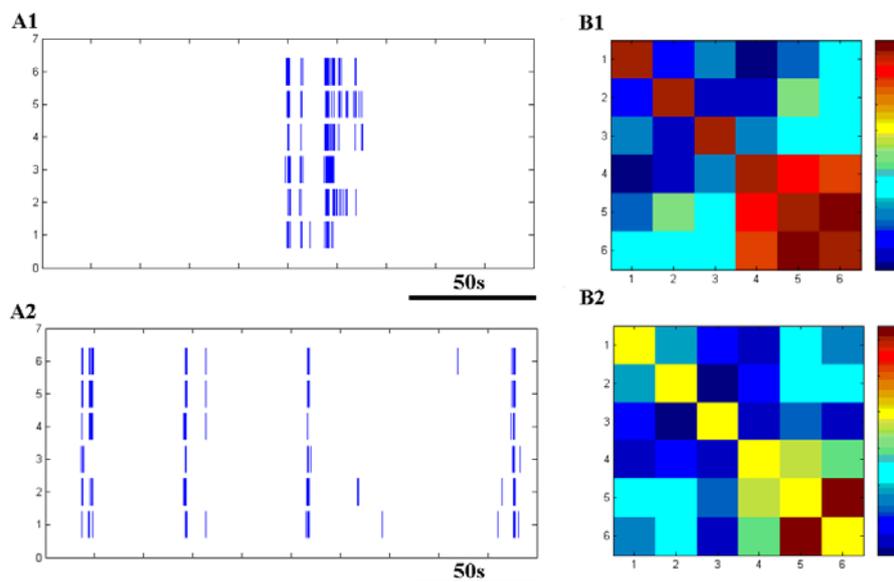


Figure IV-11. L'application de bicuculline dans un réseau à 19 DIV avec un neurone inhibiteur (neurone 3) fait apparaître des bouffées de courte durée. A1. Raster plot montrant l'activité du réseau avant l'application de bicuculline. En **B1**, la carte de corrélation d'activité entre neurones (voir définition page 113, et Fig. IV-17) correspondante révèle une assemblée composée de 3 cellules (neurones 4,5 et 6). **A2.** Activité en présence de bicuculline. **B2.** La carte de corrélation correspondante montre que les corrélations ont augmenté dans le réseau, et que l'activité du triplet (neurones 4,5 et 6) reste plus synchrone. Le neurone inhibiteur (3) se démarque par son faible niveau de corrélation.

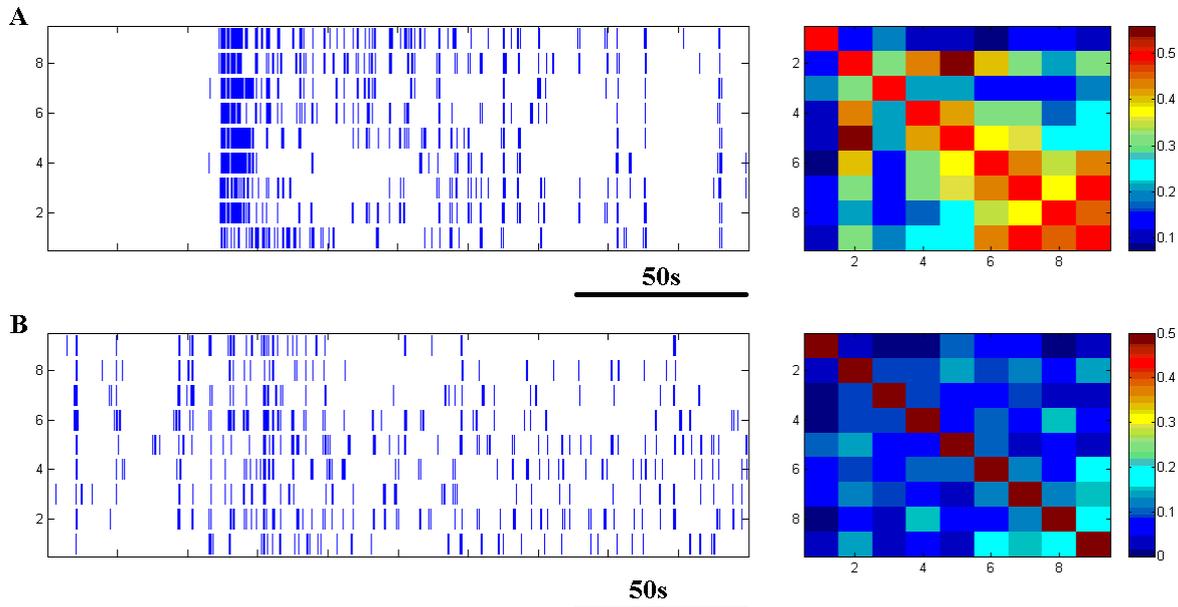


Figure IV-12. Effets de l'application de bicuculline sur l'activité d'un réseau de 9 neurones comprenant deux inhibiteurs (neurones 1 et 3). Dans la situation contrôle (**A**) on observe une activité fortement corrélée dans le réseau. La carte des corrélations (voir définition page 111, et Fig. IV-17) est caractérisée par l'émergence de plusieurs assemblées : un triplet (neurones 2, 4 et 5) et un quadruplet (neurones 6, 7, 8 et 9). L'application de bicuculline (**B**) augmente la durée de la bouffée collective (supérieure à notre fenêtre d'acquisition de 200s) et diminue la corrélation de leur activité.

Conclusion

La dynamique individuelle des neurones (définie par le profil de décharge, le niveau d'activité et la durée des bouffées) est déterminée principalement par la présence de neurone(s) inhibiteur(s) et dans une moindre mesure par le nombre total de neurones excitateurs du réseau. Nous n'avons pas mis en évidence d'effets de la distance entre neurones excitateurs sur les caractéristiques de leur décharge individuelle. En revanche, l'effet de modulation du niveau d'activité opérée par les neurones inhibiteurs est observé uniquement sur leurs voisins.

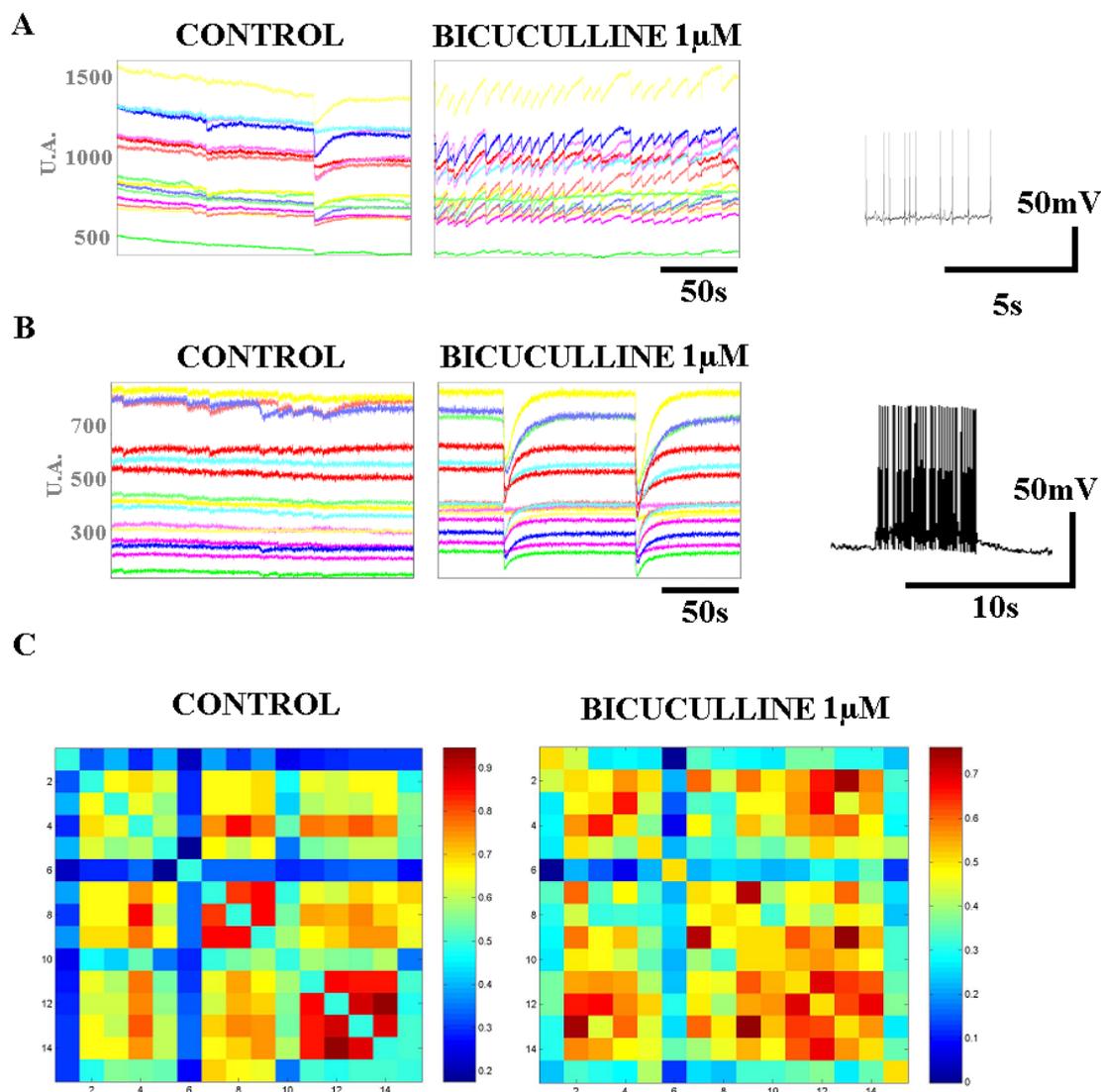


Figure IV-13. Les effets de la bicuculline (1µM) sur la durée des bouffées et la corrélation d'activité entre neurones. **A.** Dans ce réseau, la bicuculline entraîne une diminution de la durée des bouffées. **B.** Dans ce réseau, la bicuculline entraîne l'apparition de bouffées collectives massives et de longues durées. **A-B.** Un exemple d'enregistrement en mode courant imposé d'une cellule excitatrice est illustré à droite dans chaque cas. **C.** Carte de corrélation (voir définition page 111, et Fig. IV-17) du réseau indiqué en B. Dans ce réseau comprenant 15 neurones dont 4 inhibiteurs (1,6,10,15), la bicuculline entraîne une augmentation de la corrélation globale du réseau et une modification des ensembles de neurones fortement corrélés.

IV.3. Dynamique collective des neurones excitateurs

Une bouffée de potentiels d'action *collective* sera définie comme une série de potentiels d'action qui concerne au moins 50% des neurones du réseau. Nous allons étudier les corrélations d'activité entre neurones dans le réseau à différentes échelles. A une échelle macroscopique, nous allons étudier le nombre de représentations spatiales de l'activité. Nous allons définir le nombre d'*états d'activation* d'un réseau, nombre qui fait référence au nombre de représentations spatiales de l'activation collective macroscopique (voir schéma dans la Fig.IV-15). Pour toutes les paires de neurones d'un réseau, nous définirons les coefficients de corrélation d'activité (voir page 111). Nous étudierons la valeur moyenne de ce coefficient et la présence de groupes de neurones dont l'activité est fortement corrélée.

IV.3.1. Etats d'activation des réseaux

Nous allons considérer les paramètres de structure qui déterminent le nombre d'états d'activation du réseau.

IV.3.1.1. Un état d'activation unique dans les réseaux excitateurs comportant au plus 7 neurones¹²

La dynamique de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs se présente sous forme de bouffées séparées par des périodes de silence (voir IV.2.1). Ces bouffées sont collectives et l'activité des neurones est toujours fortement synchrone à une échelle macroscopique (voir Fig. IV-14) : le réseau est soit silencieux, soit actif.

IV.3.1.2. Etats d'activation multiples dans les réseaux avec un neurone inhibiteur

Lors d'une bouffée collective dans un réseau de neurones comprenant au moins un neurone inhibiteur, l'activité ne concerne plus systématiquement tous les neurones mais seulement certains sous ensembles (voir Fig. IV-15). Les neurones inhibiteurs permettent donc de multiplier les états d'activation du réseau.

¹² Dans un réseau avec 8 neurones, on a pu observer plusieurs états d'activation. En outre, dans des cultures aléatoires, les neurones s'activent très clairement de façon synchrone par petits groupes de cellules seulement. Cela laisse penser que dans un grand réseau de neurones excitateurs ($N > 10$), les états d'activation peuvent être multiples.

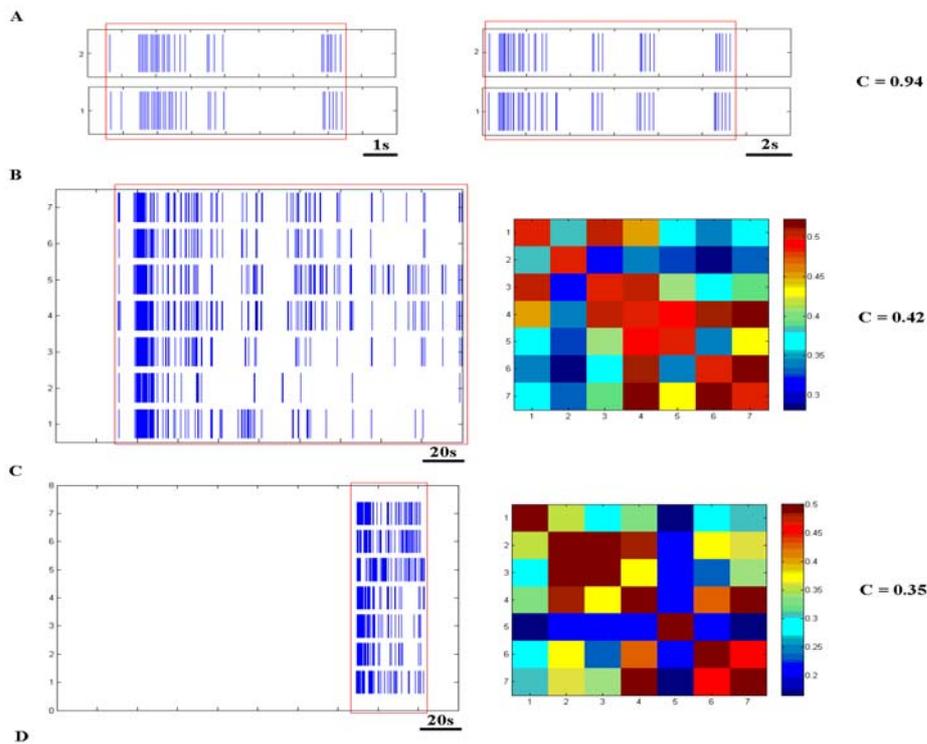


Figure IV-14. Les neurones des réseaux excitateurs s'activent collectivement : seulement un état d'activation. A. Deux bouffées successives sont représentées pour une paire isolée de neurones excitateurs. B-C. Pour deux réseaux différents, les Raster Plots et la carte de corrélation d'activité (voir définition page 113, et Fig. IV-17). La valeur moyenne du coefficient de corrélation pour chaque paire est donnée à droite. L'échelle de représentation des cartes de corrélation est automatique. Les « 1 » de la diagonale de la matrice (coefficients de corrélation de chaque neurone avec lui-même) sont fixés 0,5 afin de faciliter la lecture des cartes.

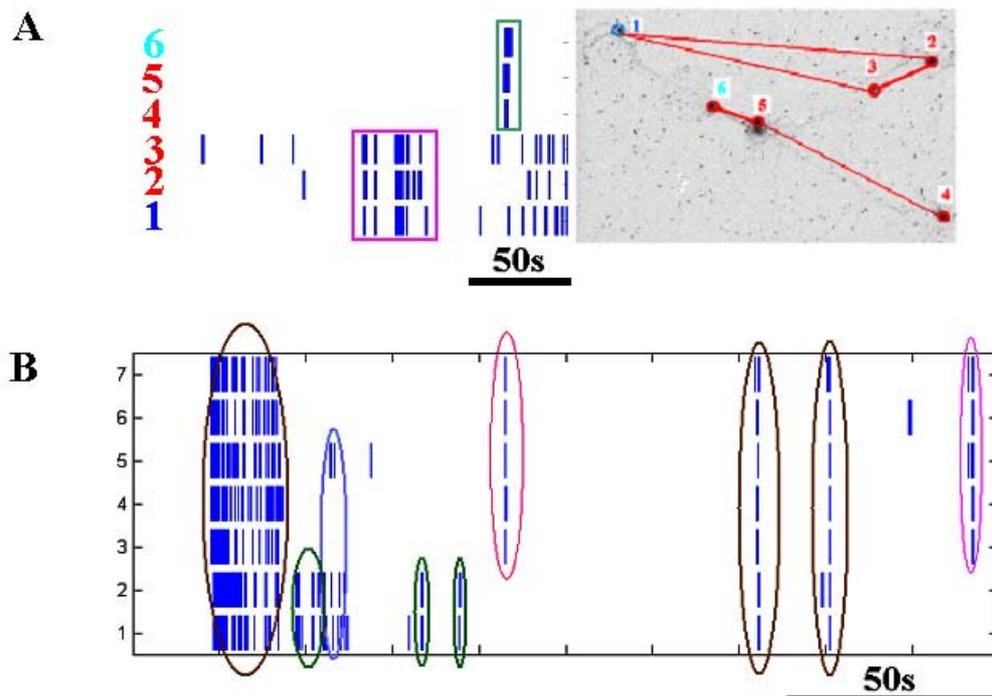


Figure IV-15. États d'activation multiples dans les réseaux comprenant un neurone inhibiteur. A. Réseau de 6 cellules avec un neurone inhibiteur (neurone 1) montre 2 états d'activation : (1, 2 et 3) et (4, 5 et 6). B. Réseau de 7 cellules montre 4 états d'activation : (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) ; (1 et 2) ; (1, 2 et 5) ; (3,4,5,6 et 7).

Conclusion

La mobilisation collective dans les réseaux purement excitateur suit une loi du tout ou rien et est vraisemblablement liée à la forte connectivité récurrente excitatrice (voir IV.1.3). Le nombre d'états d'activation est égal à un pour les réseaux excitateurs comprenant moins d'une dizaine de neurones mais pourrait augmenter dans les réseaux de plus grande taille⁷. Les neurones inhibiteurs diversifient la dynamique des neurones excitateurs, empêchant en particulier l'activation synchrone systématique de tous les neurones. Le nombre d'états d'activation d'un réseau dépend donc du nombre total de neurones excitateurs et de la présence de neurones inhibiteurs au sein du réseau.

IV.3.2. Niveau de synchronisation moyen

Nous allons évaluer le degré de synchronisation des neurones 2 à 2 par le calcul du coefficient de corrélation pour chaque paire de neurones du réseau. Comme indice de synchronisation, nous avons utilisé les coefficients de corrélation à temps $t=0$ entre paires de neurones. Pour chaque neurone d'un réseau, au temps t , on définit la fonction $s_x(t)$ de telle façon que $s_x(t) = 1$ lorsque le neurone x fait un potentiel d'action, et $s_x(t)=0$ sinon. Pour deux neurones i et j , le coefficient de corrélation à $t=0$ est défini par:

$$C_{ij} = \frac{\langle s_i(t)s_j(t) \rangle - \langle s_i \rangle \langle s_j \rangle}{\sqrt{\text{var}(s_i)}\sqrt{\text{var}(s_j)}}$$

Cet indice renseigne sur la corrélation de l'activité des neurones i et j dans une fenêtre de temps de 50ms définie par la fréquence d'acquisition : C_{ij} est égal à 1 si les neurones i et j font toujours des potentiels d'action simultanément, à 0 si leur activité n'est pas corrélée et à -1 si leur activité est anti-corrélée. Nous allons étudier d'abord les effets du nombre de neurones et des inhibiteurs sur la valeur du coefficient de corrélation moyen pour un réseau.

IV.3.2.1. Diminution avec le nombre total de neurones excitateurs

Dans tous les réseaux excitateurs, la synchronisation de l'activité des neurones est grande comme l'indique les valeurs positives et très élevées des coefficients de corrélation moyens entre paires de neurones distincts (entre 0,3 et 0,95 dans les Fig. IV-14B,C). La synchronisation moyenne entre 2 neurones diminue avec le nombre total de neurones (voir Fig. IV-14) : de 0.87 ± 0.04 pour une paire isolée ($n=4$), il passe à 0.41 ± 0.1 pour des réseaux de 7 à 8 neurones ($n=5$).

IV.3.2.2. Effets des neurones inhibiteurs

Dans un réseau qui comporte un neurone inhibiteur au moins, la corrélation moyenne de l'activité des neurones excitateurs décroît avec la proportion de neurones inhibiteurs (de 0.61 à 0.22, voir Fig. IV-16A)¹³. Cela conforte l'idée que les neurones inhibiteurs constituent un frein à la propagation de l'excitation et empêchent l'activation collective de tout le réseau observée dans les réseaux purement excitateurs.

Néanmoins l'action des neurones inhibiteurs sur la corrélation d'activité entre neurones excitateurs semblent assez complexe. En effet, l'application de bicuculline (1 μ M) peut avoir des effets variables sur la synchronisation des neurones dans une bouffée. L'activité des neurones est rendue parfois plus synchrone (Fig. IV-11), parfois moins synchrone (Fig. IV-12 et Fig. IV-13C). Les effets antagonistes de la bicuculline sur la corrélation entre paires de neurones excitateurs illustre la diversité des rôles des inhibiteurs qui peut s'expliquer par leurs caractéristiques intrinsèques et la nature de leur connectivité avec les autres neurones du réseau.

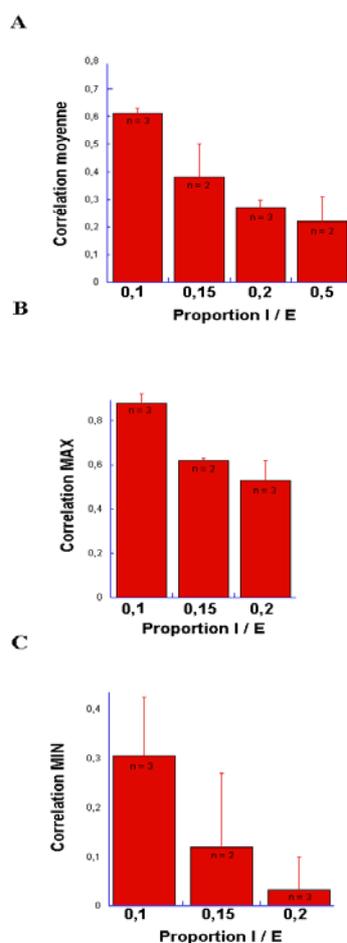


Figure V-16. Evolution des corrélations entre neurones excitateurs en fonction de la proportion en inhibiteur dans le réseau. A. Histogramme des corrélations moyennes entre neurones excitateurs. **B.** Histogrammes des corrélations maximales. **C.** Histogramme des corrélations minimales. L'augmentation de la proportion en neurones inhibiteurs est accompagnée d'une diminution de la corrélation (moyenne, maximale et minimale) entre paires de neurones excitateurs.

¹³ Il en va de même pour les valeurs de corrélation minimale et maximale dans un réseau (Fig. IV-16B et IV-16C).

Conclusion

Le niveau *moyen* de synchronisation entre neurones excitateurs va donc diminuer avec le nombre de neurones excitateurs et inhibiteurs dans le réseau.

IV.3.3. Assemblées de neurones synchrones

Nous avons représenté l'ensemble des coefficients de corrélation d'activité à $t=0$ des paires d'un réseau sous la forme d'une matrice de corrélation (voir Fig. IV-17). Analysons si, et en fonction de quels paramètres, il émerge des groupes de neurones dont l'activité est fortement corrélée. Notre définition va rester empirique, nous appellerons des *assemblées de neurones synchrones* des groupes de neurones liés par des coefficients de corrélation supérieurs à 0.4.

	1	2		i	j	n
1	1	$C_{1,2}$				
2	$C_{1,2}$	1				
			1			
i				1	C_{ij}	
j				C_{ij}	1	
n						1

Fig. IV-17. Représentation de la matrice ou carte de corrélation de l'activité à $t = 0$ entre paire de neurones dans un réseau à n neurones. Cette matrice est symétrique puisque $C_{ij} = C_{ji}$ et sa diagonale est constituée uniquement de 1.

IV.3.3.1. Emergence avec le nombre croissant de neurones excitateurs dans un réseau

A l'instar des paires où les deux neurones connectés sont pratiquement toujours synchrones ($C_{1,2}$ coefficient de corrélation à $t=0$ compris entre 0,82 et 0,95), nous avons vu que la corrélation moyenne diminue dans les réseaux d'une dizaine de neurones (Fig. IV-14). En revanche, la représentation des coefficients de corrélation à $t=0$ des neurones pris 2 à 2 sous forme d'une carte à 2 dimensions permet de faire apparaître dans ces réseaux des groupes de cellules (paires ou triplets en général) liés par une activité très synchrones (voir Fig. IV-14) que nous appellerons *assemblées synchrones* (voir Fig. IV-18A, les neurones (4, 6 et 7) ; Fig. IV-18B, neurones (2, 3, 4, 6 et 7) ; Fig. IV-18C, neurones (5,6,7)). La détermination de ces assemblées synchrones est très stable. Lorsque nous avons enregistré sur plusieurs fenêtres de 200s l'activité d'un même réseau, nous avons remarqué que la carte de corrélation présentait les mêmes motifs d'une acquisition à l'autre indiquant que les mêmes neurones constituent des assemblées de neurones synchrones (comparer Fig. IV-8 A et B).

IV.3.3.2. Constitution fondée sur la connectivité entre neurones excitateurs

En comparant la géométrie de réseaux excitateurs aux cartes des corrélations entre paires à $t=0$ correspondantes (voir Fig. IV-19), nous avons remarqué trois points :

- 1) les neurones d'une même assemblée sont généralement localisés sur le même domaine ou sur des domaines voisins (voir Fig. IV-19).
- 2) les neurones qui appartiennent à plusieurs assemblées ont tendance à avoir une position centrale (voir le neurone 3 Fig. IV-19A, et le neurone 4 Fig. IV-19B).
- 3) les neurones dont l'activité individuelle est peu corrélée au reste du réseau sont éloignés et localisés en général à l'extrémité d'une branche (voir le neurone 2 Fig. IV-19A, le neurone 1 Fig. IV-19B, le neurone 4 et 8 de la Fig. IV-19C).

La diminution de la corrélation avec la distance entre neurones (Fig. IV-18) suggère qu'en effet, dans les réseaux, le gradient de connectivité entre neurones excitateurs est à l'origine de l'émergence de sous-ensembles synchrones. Les réseaux de neurones excitateurs d'une dizaine de cellules sont assimilables à de petites assemblées de neurones excitateurs (triplets, paires et autapses) au sein desquelles les neurones sont fortement connectés entre eux.

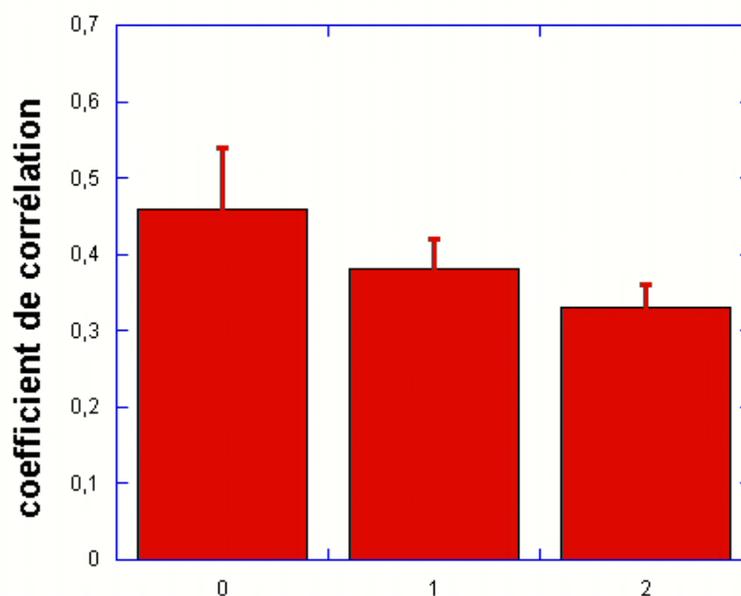


Figure IV-19. Correspondance entre distance et corrélation d'activité entre neurones dans des réseaux excitateurs. Neurones sur le même disque : 0 ; premiers voisins : 1 ; seconds voisins : 2. La corrélation d'activité tout comme la connectivité (voir Fig. IV-1 et Fig. IV-2) diminue avec la distance dans le réseau.

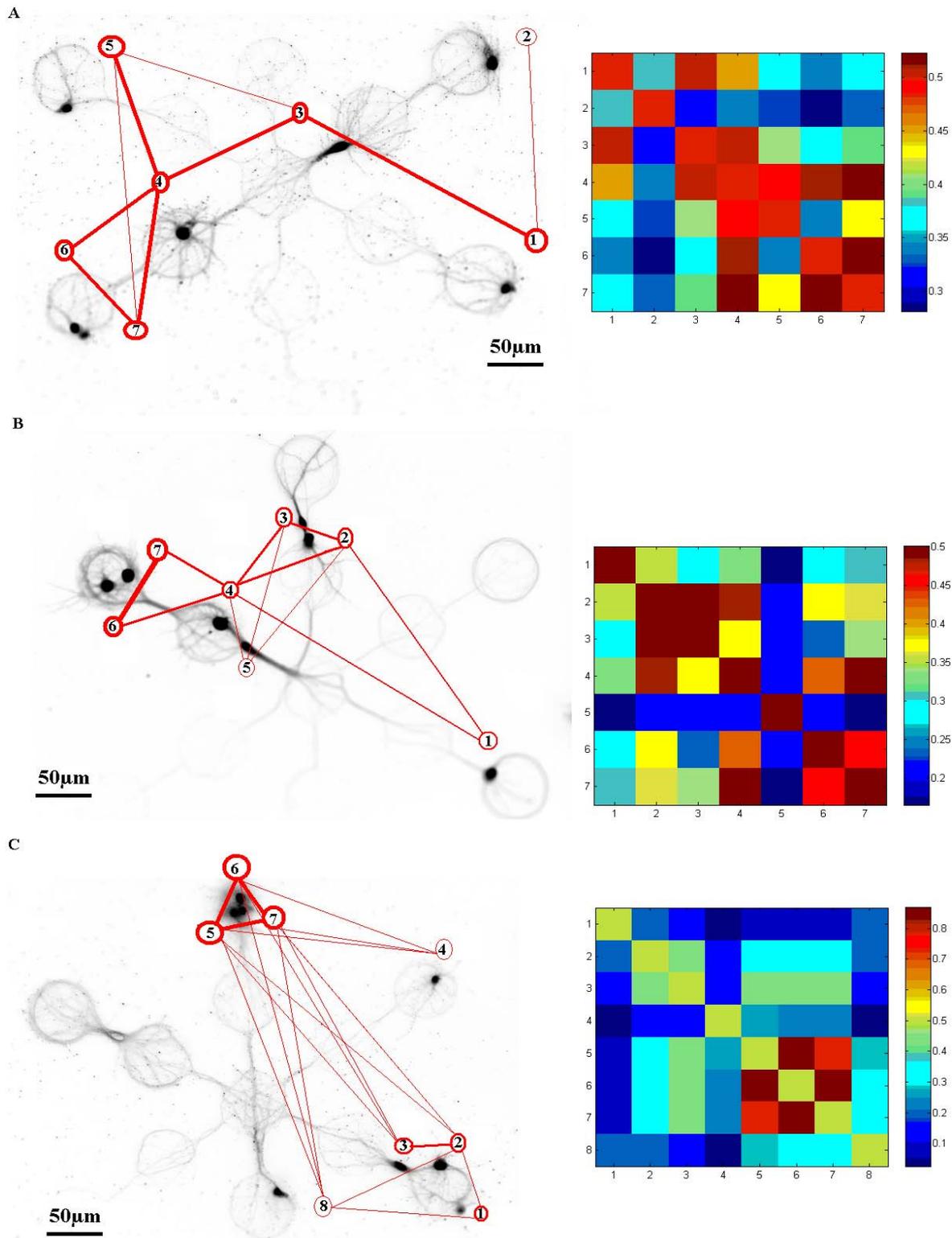


Figure IV-18. Correspondance entre géométrie et corrélation d'activité au sein de trois réseaux excitateurs avec 7 à 8 neurones. Trois exemples de réseaux sont représentés en A,B,C. Pour chacun, à gauche se trouve un négatif de l'image de fluorescence du réseau et à droite la carte de corrélation d'activité (voir définition page 111, et Fig. IV-17). Un trait rouge lie les neurones qui forment les paires les plus corrélées. L'épaisseur du trait est représentative du degré de corrélation de l'activité.

IV.3.3.3. Segmentation des assemblées de neurones synchrones accentuée par les neurones inhibiteurs

La corrélation moyenne entre neurones excitateurs diminue avec la proportion d'inhibiteurs dans un réseau (voir IV.3.2.2, et Fig.IV-14). Néanmoins, dans un réseau avec 10% d'inhibiteurs la corrélation moyenne entre neurones excitateurs est très élevée ($C = 0.61 \pm 0.02$, $n = 4$ pour les réseaux de 10 neurones avec un inhibiteur), du même ordre de grandeur que dans les réseaux excitateurs purs avec le même nombre de cellules ($C = 0.51 \pm 0.19$). Les neurones inhibiteurs n'empêchent donc pas la synchronie de paires de neurones excitateurs, ils ont un effet de diminution des corrélations entre neurones excitateurs qui dépend de la distance (voir Fig. 20). En effet, dans l'ensemble des réseaux qui comprenait un inhibiteur au moins, on observe des assemblées de cellules :

- 1) à l'intérieur desquelles, l'activité des neurones est très fortement synchronisée (voir le sextuplet constitué des neurones (6, 7, 8, 9, 10 et 11) Fig. IV-6C ; la paire (2, 3) et (5, 6) Fig. IV-7C ; les triplets (1, 2 et 3) et (9, 10 et 11) Fig. IV-21C ; les quadruplets (1, 2, 3 et 4) et (5,6,9 et 10) Fig. IV-22C, la paire (6,7) Fig. IV-23D ; les paires (3,4), (5,6) et (9,10) Fig. IV-24D; le quadruplet (6, 7, 8 et 9) et le triplet (2, 4 et 5) Fig. A1-1).
- 2) dont les activités sont peu corrélées entre elles (voir l'exemple Fig. IV-7 où les deux assemblées (1,5 et 6) et (2, 3 et 4) sont activées indépendamment).

En outre, ils diminuent la corrélation de l'activité de leurs premiers voisins avec le reste du réseau (voir les neurones 2 et 12, Fig. IV-6C ; le neurone 5 Fig. V-21C, le neurone 7 Fig. IV-22C, le neurone 2 Fig. IV-23D). Les neurones inhibiteurs ont une double action : globale, sur la segmentation des assemblées synchrones et locale, sur l'exclusion de leur voisin proche.

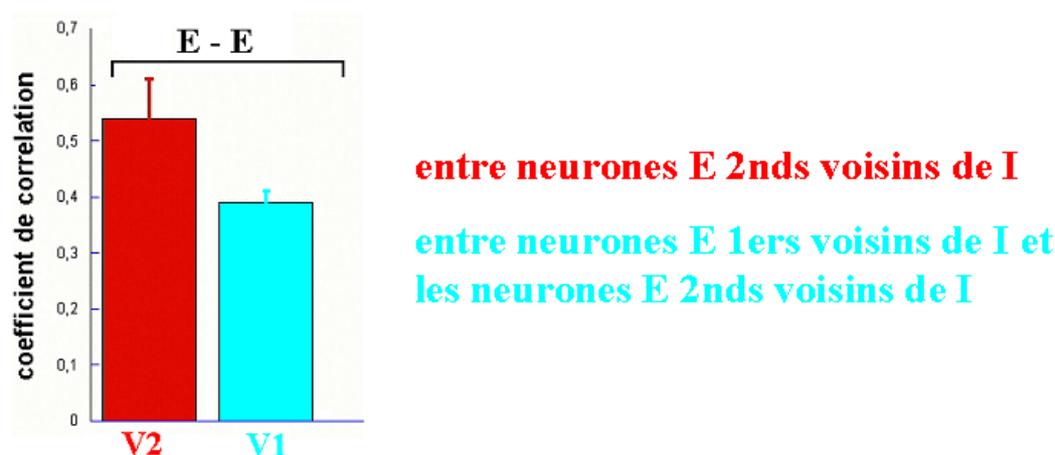


Figure IV-20. La corrélation entre neurones excitateurs dépend de la distance au neurone inhibiteur. Neurones sur le même disque : 0 ; premiers voisins : 1 ; seconds voisins : 2. La corrélation d'activité tout comme la connectivité diminue avec la distance dans le réseau (voir Fig. IV-1 et Fig. IV-2).

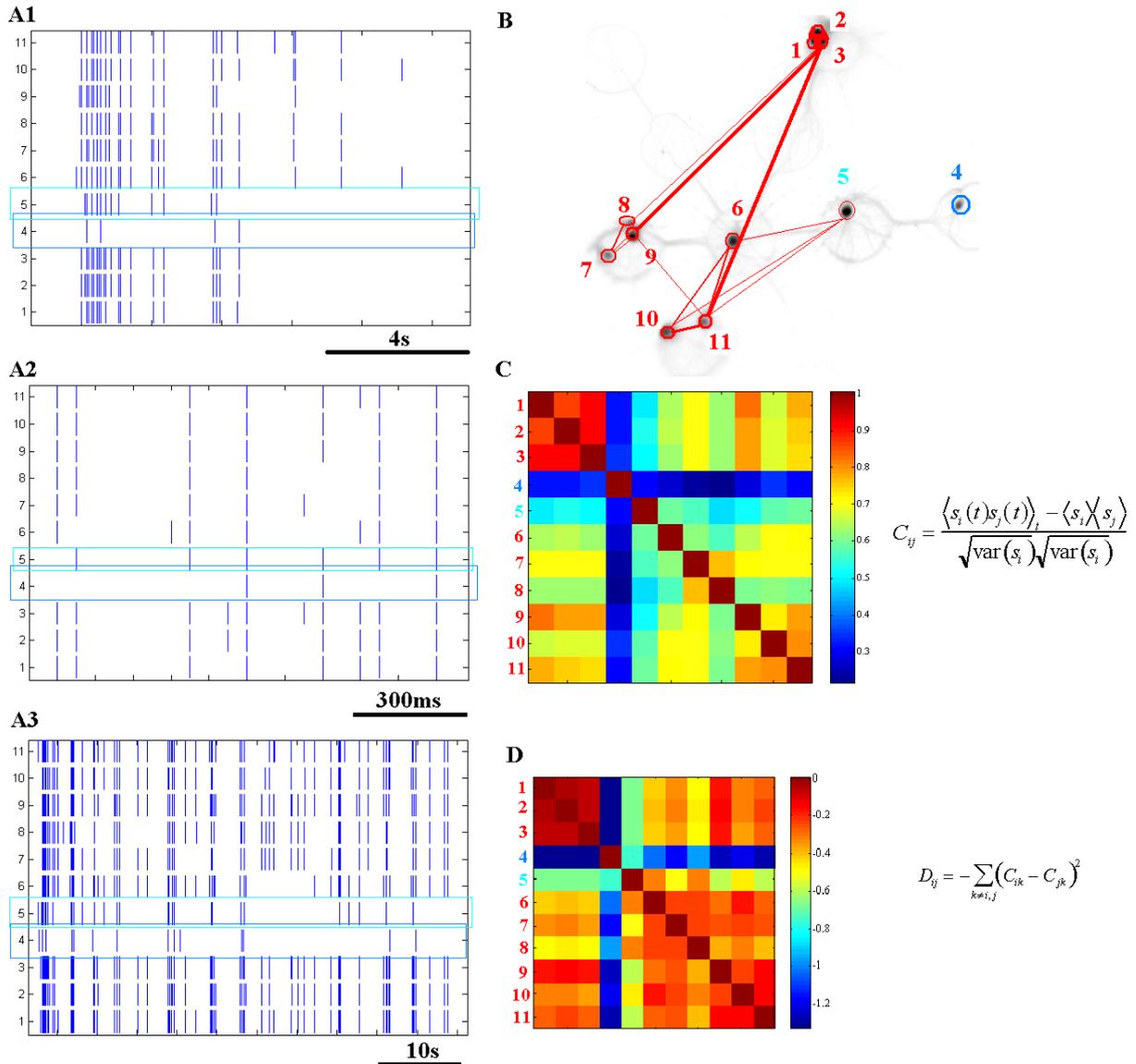


Figure IV-21. Activité d'un réseau de 10 neurones comprenant un inhibiteur (neurone 4) à 18DIV. A1-A3. Raster plots de l'activité lors de 3 bouffées collectives successives. On note que le neurone inhibiteur (encadré en bleu foncé) fait à chaque fois moins de potentiels d'action que les autres neurones du réseau et s'active en retard lors du démarrage d'une bouffée. Son premier voisin le neurone 5 (encadré en cyan) s'active avec 11 en premier lors de la troisième bouffée et le neurone 4 suit immédiatement. **B.** Sur le négatif de l'image de fluorescence sont représentés les liens entre neurones d'épaisseur proportionnelle aux coefficients de corrélation à $t = 0$ pour les paires de neurones les plus corrélées. On remarque que le neurone 4 est isolé en bout de branche avec les neurones 5 et 6 comme premier et deuxième voisins. **C.** Carte de corrélation à $t = 0$ entre les paires du réseau (voir définition page 111, et Fig. IV-17). Exceptionnellement, vues les valeurs élevées de corrélation, la diagonale est composée ici de 1 pour aider la lecture de la carte de corrélation. Les triplets constitués par les neurones 1, 2 et 3 et 9, 10 et 11 constituent deux sous assemblées de neurones synchrones dans le réseau. Avec le reste du réseau, la corrélation du neurone inhibiteur 4 est minimale et les neurones 5 et 6 ont des coefficients de corrélation intermédiaires témoignant probablement de l'inhibition qu'ils reçoivent du neurone 4. **D.** Carte de distance entre neurones dans le réseau. Le coefficient de distance entre neurones, dont la formule est donnée à droite de la carte, renseigne sur la similarité entre l'interaction de chacun des neurones avec le reste du réseau. On note la similarité entre la carte de corrélation à $t = 0$ et la carte des distances ce qui signifie que les neurones dont l'activité est fortement corrélée entre eux ont tendance à se comporter de façon similaire avec le reste du réseau. Il existe quelques exceptions telles que la paire constituée par les neurones 6 et 7 : leur activité est peu corrélée mais montre de fortes similitudes à l'égard du reste du réseau.

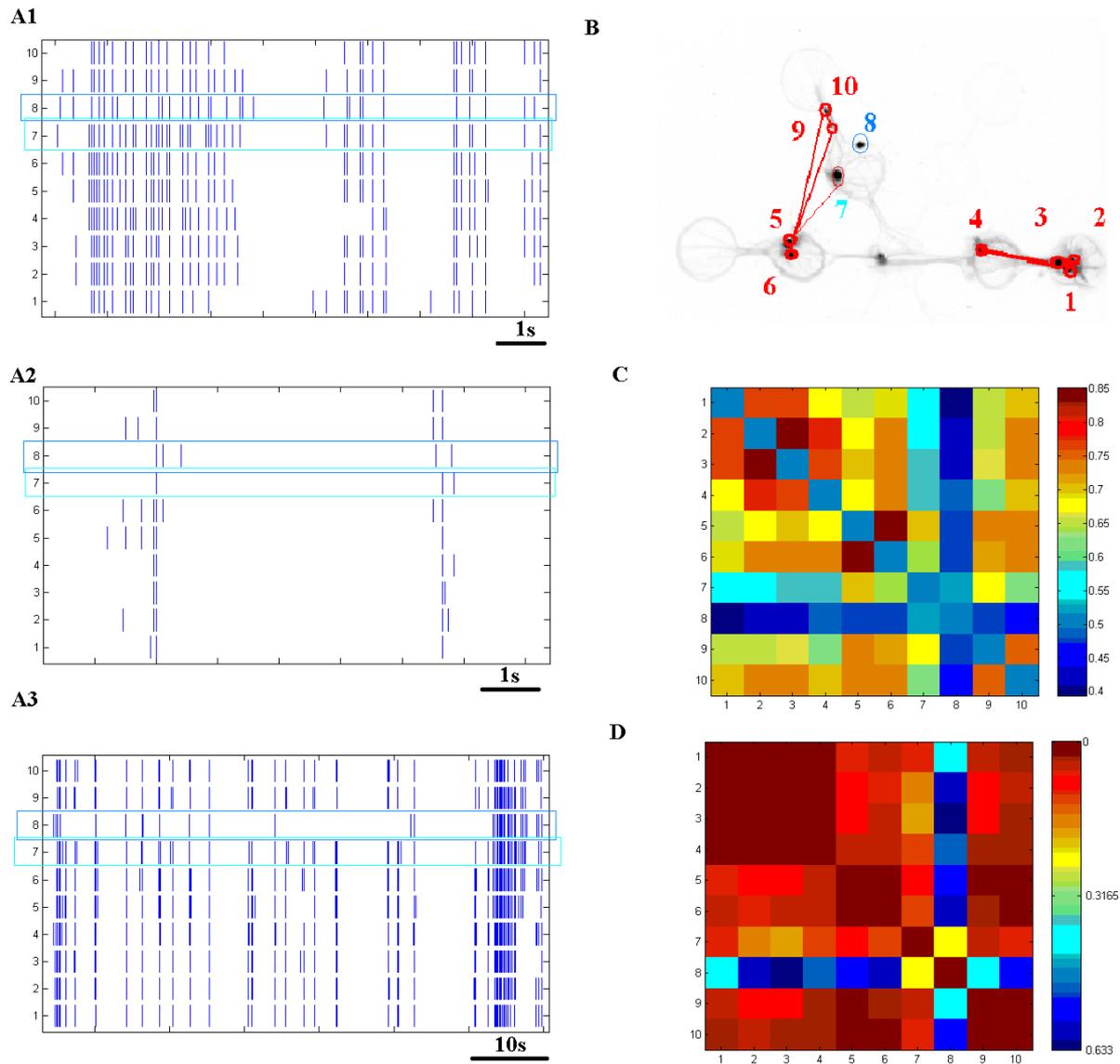


Figure IV-22. Activité d'un réseau de dix neurones à 18DIV comprenant un inhibiteur (neurone 8 qui a comme premier voisin le neurone 7). A1-A3. Raster plots montrant l'activation du réseau lors de 3 bouffées successives. A1. Dans la première bouffée, le neurone 7 s'active et 8 le suit. A2. Dans la deuxième, un petit sous groupe s'active d'abord et déclenche l'activité dans l'ensemble du réseau ; le neurone 8 s'active seulement avec tout le réseau. A3. Dans la troisième bouffée, le neurone 8 s'active avec le neurone 4 initiant l'activité. B. Le négatif de l'image de fluorescence montre que les neurones 8 et 7 sont situés de façon assez centrale dans le réseau entre les paires de neurones excitateurs 9/10, 5/6 et le quadruplet 1/2/3/4. C. La carte de corrélation à $t = 0$ (voir définition page 111, et Fig. IV-17) montre que l'activité est fortement corrélée au sein de ces sous-ensembles ($C > 0.75$). Le neurone 8 se démarque par des coefficients de corrélation minimaux avec le reste du réseau ($c \sim 0.4$) et son voisin (7) a un statut intermédiaire entre les neurones excitateurs des assemblées et le neurone inhibiteur ($0.5 < C < 0.65$). On peut noter aussi que les neurones des paires qui entourent le neurone 8 ont une activité moins corrélée que les neurones du quadruplet plus distant. D. La carte de distance entre neurones (voir définition Fig. IV-21) montre à nouveau le statut particulier du neurone inhibiteur dont l'activité se rapproche le plus de ses premiers voisins 7 et 9.

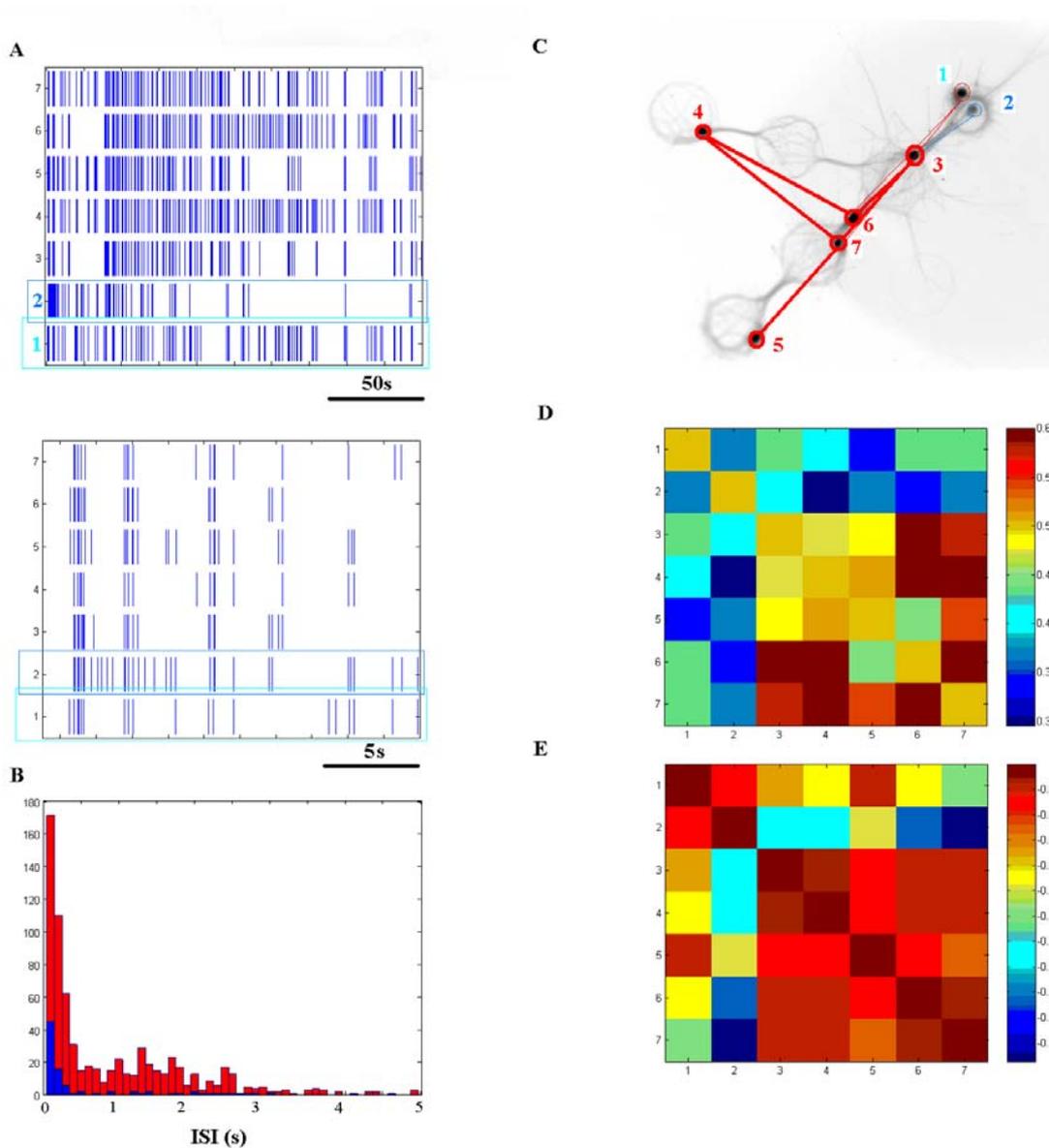


Figure IV-23. Activité d'un réseau de sept neurones comprenant un inhibiteur à 18DIV. Le neurone inhibiteur 2 a comme premier voisin le neurone 1. A. Raster plot montrant les activations collectives du réseau qui ont lieu pendant 200s. Un zoom est représenté en dessous pour montrer l'ordre d'activation des neurones lorsque tout le réseau est impliqué. On remarque que le neurone 1 déclenche l'activité et est suivi par le neurone 2. B. Distribution des ISIs pour le neurone 2 (histogramme bleu) et les neurones excitateurs du réseau (histogramme rouge). Le négatif de l'image de fluorescence montre que les neurones 2 et 1 sont situés à la périphérie du réseau à distance de la paire constituée par les neurones 6 et 7 au centre. C. Image du réseau avec la représentation des coefficients de corrélation d'activité les plus élevés entre neurones. D. La carte de corrélation à $t = 0$ (voir définition page 111, et Fig. IV-17) montre que l'activité est fortement corrélée au sein de cette paire ($C \sim 0.6$) et entre la paire et les neurones excitateurs 3,4 et 5 isolés. Le neurone 2 a les coefficients de corrélation à $t = 0$ les plus bas du réseau ($0.3 < C < 0.4$) et son voisin (1) a un statut intermédiaire entre les neurones excitateurs de l'assemblée constituée par 3,4,5,6 et 7 et le neurone inhibiteur ($C < 0.45$). E. La carte de distance entre neurones (voir définition Fig. IV-21) montre à nouveau le statut particulier du neurone inhibiteur 2 dont l'activité se rapproche le plus de son premier voisin 1.

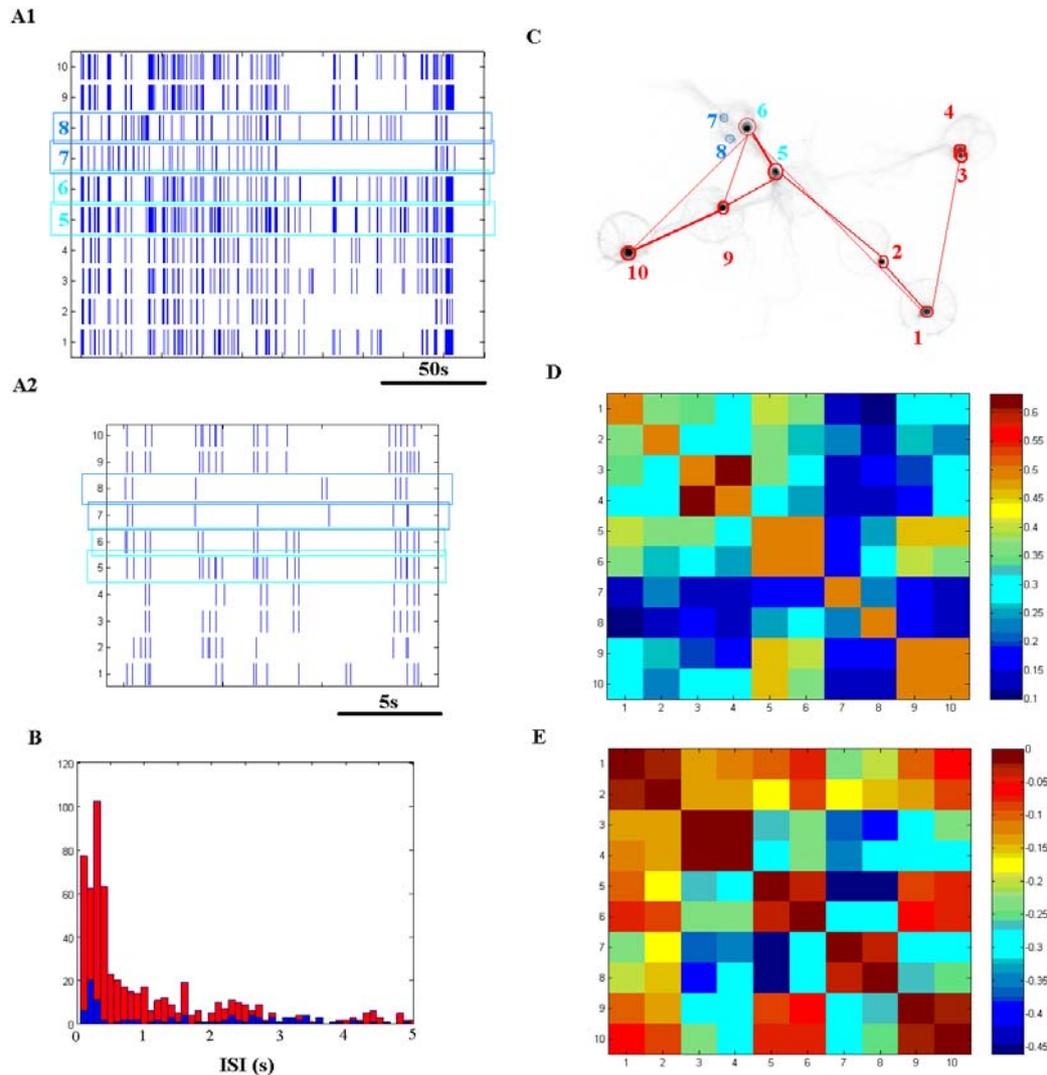


Figure IV-24. Activité d'un réseau de 10 neurones avec 2 inhibiteurs, les neurones 7 et 8, à 18 DIV. A1. Le Raster Plot de l'activité pendant 200s montre que 7 et 8 font moins de potentiels d'action que le reste du réseau. A2. Un grossissement du démarrage de la bouffée montre que les neurones 6 et 8 sont les premiers à déclencher un potentiel d'action. B. Distribution des intervalles entre potentiels d'action pour les neurones excitateurs (histogramme rouge) et les neurones inhibiteurs (histogramme bleu). C. Le négatif de l'image de fluorescence montre que les neurones inhibiteurs sont sur le même disque avec comme premiers voisins les neurones 6 et 5. D. La carte de corrélation (voir définition page 111, et Fig. IV-17) fait apparaître trois assemblées avec des coefficients de corrélation de l'ordre de 0.5 sous forme de paires constituées des neurones 3 et 4, 5 et 6 et enfin 9 et 10. Les neurones inhibiteurs sont caractérisés par des coefficients de corrélation minimum ($C < 0.3$). E. La carte de distance entre neurones (voir définition Fig. IV-21) fait apparaître au sein d'une paire synchrones la similitude des interactions des neurones avec le reste du réseau. La carte de distance fait aussi apparaître des similitudes entre les neurones 1 et 2 dont l'activité n'était pas très corrélée. On peut faire la même remarque pour la paire de neurones inhibiteurs 7 et 8 qui bien qu'étant peu corrélée a des coefficients similaires vis à vis du reste du réseau.

Conclusion

L'émergence d'une assemblée de neurones synchrones dépend donc de la proximité entre les neurones excitateurs qui la constituent et de leur position par rapport au(x) neurone(s) inhibiteur(s). Les neurones inhibiteurs, dont l'activité est faiblement corrélée avec celle du reste du réseau, sont en général exclus de ces assemblées.

Conclusion

Les neurones excitateurs des réseaux d'architecture contrôlée purement excitateurs d'une dizaine de neurones montrent une dynamique de l'activité spontanée commune très robuste, et constituent localement des petits ensembles synchrones. Au sein d'un réseau de neurones excitateurs, les cellules GABAergiques ont plusieurs actions importantes sur la dynamique des neurones excitateurs: *i*) elles diversifient la dynamique collective en empêchant les bouffées synchrones des neurones excitateurs, *ii*) elles modèrent l'activation des neurones excitateurs voisins sans diminuer le niveau d'activité global; *iii*) elles participent à la définition des assemblées synchrones de neurones excitateurs. Les neurones inhibiteurs déterminent les assemblées synchrones et permettent leur activation indépendante empêchant l'activation synchrone systématique de tous les excitateurs¹⁴. Ces actions des neurones inhibiteurs sont conservés dans l'ensemble des réseaux étudiés. En revanche, les caractéristiques de l'activation des neurones inhibiteurs dans une bouffée, de leur action sur la durée des bouffées ou sur le niveau de synchronisation des neurones excitateurs varient d'un réseau à l'autre (voir Annexe 1) montrant la grande diversité d'action des cellules GABAergiques.

¹⁴ On observe qu'ils ne diminuent pas le niveau d'activité global du réseau. Ce résultat corrobore l'observation que la balance excitation / inhibition est constante dans différents états d'activation des réseaux corticaux ou striataux (Blackwell KT, Czubayko U, Plenz D (2003) Quantitative estimate of synaptic inputs to striatal neurons during up and down states in vitro. J Neurosci 23:9123-9132, Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. Nature 423:288-293.

DISCUSSION

Dans une première partie, je considérerai les intérêts de l'approche de photolithographie à l'origine des réseaux d'architecture contrôlée, en dégagant les caractéristiques spécifiques des neurones qui s'y développent et de la structure fonctionnelle qui se forme spontanément. Je présenterai ensuite les mécanismes synaptiques et propriétés de réseaux mis en œuvre dans l'initiation et la maintenance de la génération de bouffées dans les réseaux excitateurs plus ou moins synchrones. Puis je dégagerai dans quelle mesure l'architecture détermine la structure fonctionnelle d'un réseau et impose un ou plusieurs états d'activation possibles. Je confronterai les résultats obtenus dans les réseaux d'architecture contrôlée aux exemples d'activité spontanée des réseaux immatures et matures qui ont été évoqués en introduction de cette thèse. Je discuterai des caractéristiques et actions des neurones inhibiteurs dans notre système. Je discuterai enfin des mécanismes de régulation dépendant de l'activité qui semblent être mis en œuvre dans le développement des réseaux de neurones d'architecture contrôlée isolés *in vitro*.

1. De l'approche des réseaux de neurones d'architecture contrôlée

1.1. Intérêts majeurs de la technique

1.1.1. Simplicité d'obtention et reproductibilité

Le protocole de photolithographie nécessite un équipement minimum : une hotte stérile, une tournette pour déposer et étaler la résine photosensible, un générateur de plasma d'eau pour nettoyer les surfaces des silanes résiduels. Les masques nécessaires à la lithographie que j'ai réalisés en utilisant un évaporateur de Chrome, peuvent être obtenus commercialement.

Le protocole est très reproductible et fonctionne en routine avec un protocole de culture primaire classique (Banker and Goslin, 1988). Les deux conditions critiques à respecter sont l'absence de sérum et l'ajout d'un agent antimitotique (AraC) pour permettre la maintenance sur le long terme des motifs d'adhésion.

Le protocole doit pouvoir être appliqué à d'autres types de culture. Nous avons réalisé avec l'équipe de Frank Pfrieder (Centre de Neurochimie, Strasbourg) des essais avec des neurones de la rétine qui se sont bien développés sur les réseaux d'architecture contrôlée (Fig. D-1).

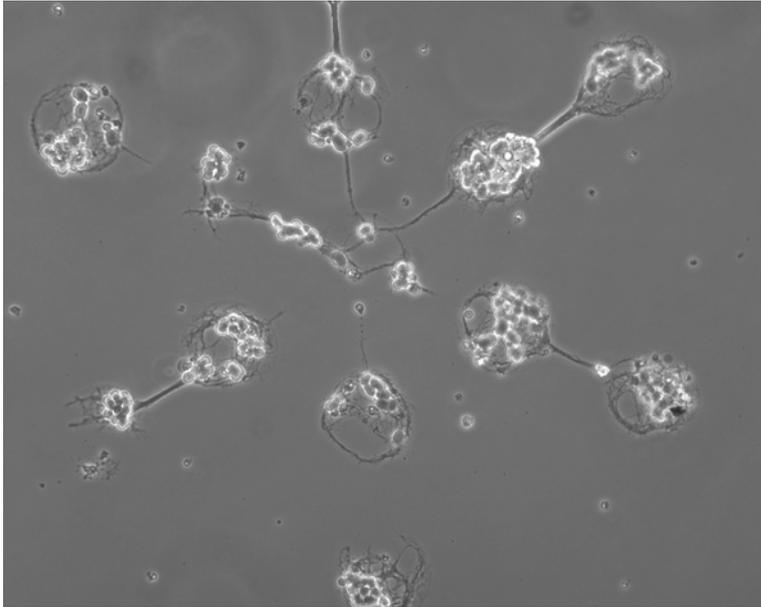


Figure D-1. Le protocole de lithographie est applicable à d'autres types cellulaires. Les cellules de la rétine (2 jours sur l'image de DIC) poussent sur les motifs de polylysine uniquement. Ces premiers essais ont été réalisés avec Frank Pfrieger avec une densité élevée en cellules pour vérifier que les motifs étaient respectés.

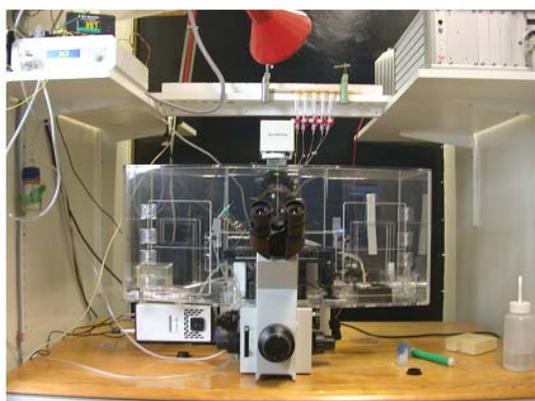
1.1.2. Un outil pour les études sur le développement

On peut facilement suivre l'évolution des neurones d'un même réseau d'architecture contrôlée à long terme (1 mois). En time-lapse avec Emmanuel Jover dans le laboratoire Inserm de Neurophysiologie cellulaire et intégrée à Strasbourg, nous avons observé un même réseau sur une semaine (voir Fig. D-2). Nous avons mis en évidence *i*) qu'après l'ensemencement les neurites envahissent en moins d'une semaine tout le réseau et *ii*) que les corps cellulaires des neurones restent à des positions fixes (comparer les deux panneaux, Fig. D-2). Ainsi à l'instar des cultures standard, la position des corps cellulaires ne change pas au cours du développement des neurones. Sans même utiliser le time lapse, on pourra facilement reconnaître un réseau avec une disposition donnée des neurones et le suivre pendant des semaines et étudier l'évolution des interactions entre deux neurones identifiés au cours du temps.

Un avantage des réseaux d'architecture contrôlée par rapport à la culture standard réside dans le fait que les neurones voisins ont dès 2-3 semaines une grande probabilité de former des synapses entre eux (voir Chapitre I, IV). On peut donc grâce aux réseaux d'architecture contrôlée suivre sur un mois l'évolution des synapses formées entre deux neurones identifiés. Ce point est une grande avancée dans la technique des cultures cellulaires, permettant en particulier de suivre les effets de traitements chroniques sur le développement de synapses identifiées. De plus, l'activité électrique des réseaux peut être suivie sur de longues périodes. D'une part, j'ai observé que le marquage de neurones avec le Fura 2 AM peut être répété d'un jour à l'autre. L'imagerie calcique permet donc de suivre l'évolution de l'activité des

neurones sur plusieurs jours. Cependant l'imagerie calcique comporte certains problèmes liés à la faible résolution temporelle et à la toxicité du métabolisme des sondes AM. Ces limitations nous ont motivé à réaliser le couplage de la lithographie aux MEAs (MultiElectrode Arrays, voir l'Annexe II (Hammerle et al., 1994; Jimbo et al., 1999)). La combinaison de ces deux approches devrait permettre d'enregistrer sans toxicité et avec une bonne résolution temporelle (\sim ms) tous les neurones simultanément d'un même réseau. Les électrodes des MEAs permettront aussi de stimuler les neurones sélectivement (Jimbo et al., 2003).

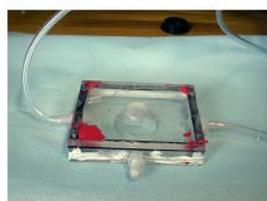
A



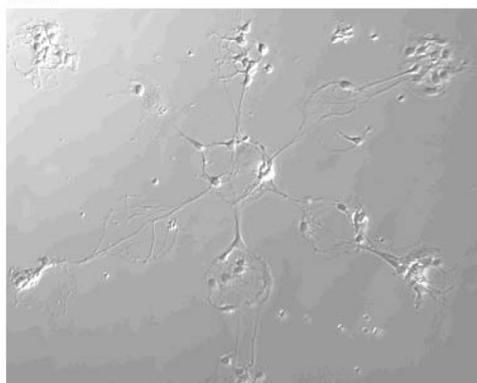
B



C



D1



D2

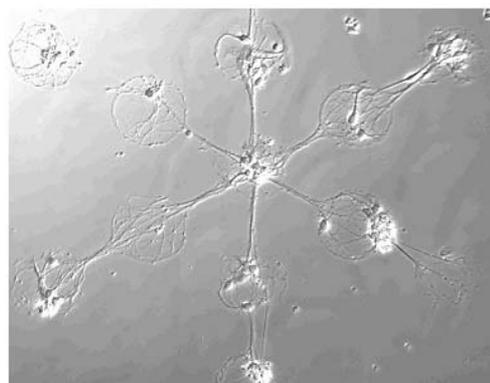


Figure 2. Le suivi des neurones d'un même réseau en time lapse montre que les neurones ne se déplacent pas d'un disque à l'autre. **A.** Le microscope Olympus est commercialisé avec une cage en plexiglass et un système de régulation (une plaque chauffante où repose la culture et un système de chauffage pour la boîte) afin de maintenir la culture à 37°C. **B.** Système de régulation de la pression en CO₂ à 5% avec une valve contrôlée électroniquement. **C.** La régulation du CO₂ n'est effectuée que dans une petite boîte dans laquelle est placée la boîte de pétri avec les neurones. **D.** Images tirées de DIC tirées d'une acquisition durant une semaine. On voit que le réseau à 4 jours (D1) garde la même configuration à 10 jours (D2). Les neurones se sont regroupés au centre des disques et leur prolongement se lient pour former des faisceaux de fibres.

1.2. Développement des neurones dans les réseaux d'architecture contrôlée

1.2.1. Morphogénèse

Les observations en time lapse ont montré que les neurites poussent vite et ont envahi tout le motif de poly-lysine en moins d'une semaine lorsque la polarité axone - dendrite est établie (Bartlett and Banker, 1984; Dotti et al., 1988). Les marquages immunocytochimiques de la synaptophysine et de la synaptotagmine montrent que les neurones entre 2 et 3 semaines ont en général des épines dendritiques comme dans les cultures standard (Papa et al., 1995).

Si un antimétabolite est mis dans le milieu, les cellules gliales ne prolifèrent pas dans le réseau (il en reste alors moins de 5%). Lorsque les cellules gliales sont en grand nombre, elles débordent sur la monocouche de silanes et permettent aux neurones de se déplacer, portés par une cellule gliale mobile. Leur prolifération abolit donc le motif de lithographie.

1.2.2. Synaptogénèse

Gradient de connectivité

Entre 2 et 3 semaines, la présence de synapses fonctionnelles glutamatergiques entre neurones est orientée par la géométrie dans les réseaux d'architecture contrôlée. Il existe un gradient de connectivité qui ne dépend pas de la distance physique mais de la distance « fonctionnelle » définie par la position de neurones partenaires sur les disques voisins. Les neurones excitateurs enregistrés entre 2 et 3 semaines *in vitro* forment des autapses dans la plupart des cas, sont connectés à 90% avec leurs premiers voisins et à 40% avec leurs seconds voisins. Les amplitudes des EPSCs montrent que la présence de contacts monosynaptiques entre deux neurones décroît avec la distance « fonctionnelle » qui les sépare.

J'ai cherché à mettre en évidence dans les stades plus précoces (8-13 jours *in vitro*) un état où les neurones seraient connectés seulement avec leurs premiers voisins mais sans succès. La croissance des neurites en quelques jours à travers tout le motif suggère que les neurites de chaque neurone ont déjà exploré les disques et sont rentrées en contact avec celles des autres neurones du réseau lorsqu'elles établissent les premiers contacts synaptiques après quelques jours (Bartlett and Banker, 1984; van den Pol et al., 1998).

Autapses

Les autapses ont toujours été considérées comme une caractéristique spécifique de la culture (Segal and Furshpan, 1990; Segal, 1991; Shi and Rayport, 1994). Il semble néanmoins qu'elles se forment aussi dans certains neurones *in situ*. Sur des bases anatomiques de contact entre l'axone d'un neurone et son arborisation somato-dendritique, le concept d'autapse a été émis en 1972 (Van der Loos and Glaser, 1972) après observations dans différentes espèces (DiFiglia et al., 1976; Peters and Proskauer, 1980). Ces observations en microscopie optique ont été confirmées par l'utilisation de marqueurs intracellulaires (Karabelas and Purpura, 1980) et des observations en microscopie électronique (Preston et al., 1980). Depuis des enregistrements électrophysiologiques couplés à l'anatomie ont démontré la présence d'autapses fonctionnelles pour des neurones GABAergiques dans le cortex (Thomson et al., 1996; Tamas et al., 1997), l'hippocampe (Cobb et al., 1997) et le cervelet (Pouzat and Marty, 1998) ainsi que sur des neurones glutamatergiques pendant le développement (Lubke et al., 1996). Dans le cervelet par exemple, 20% des interneurons (cellules en étoile et en panier) présentent des courants autaptiques dont l'amplitude varie entre 20 et 180pA lorsqu'ils sont enregistrés à -70mV (Pouzat and Marty, 1998). La présence d'autapses dans le cerveau, en particulier pour les neurones GABAergiques, est donc bien plus importante que ce qui était suspecté. Les autapses inhibitrices sont en nombre important (Tamas et al., 1997) et pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'activité spontanée par autorégulation de l'inhibition.

Une caractéristique remarquable des réseaux qui comporte moins d'une dizaine de neurones est la présence quasi systématique d'autapses. Les neurones inhibiteurs et excitateurs sur les disques de poly-lysine forment à 3 semaines systématiquement des contacts synaptiques sur eux-mêmes. En revanche, l'amplitude des courants autaptiques diminue avec le nombre de neurones dans le réseau. Pour les neurones glutamatergiques, on mesure pour une autapse isolée des conductances de 20 à 30nS (chapitre III); pour des neurones dans une paire isolée, des conductances de 10nS (chapitre III); pour un neurone d'un réseau d'une dizaine de neurone, des conductances de 1 à 2nS (ce qui correspond à un courant de 120pA enregistré à -60mV , voir chapitres I et IV).

Dans le cas d'un réseau avec une dizaine de cellules, les amplitudes des courants autaptiques sont donc du même ordre de grandeur que ce qui a été observé dans les neurones à autapses *in vivo*. Néanmoins dans ces réseaux, ils sont détectés dans *tous* les neurones du réseau. Ainsi les conséquences de la présence d'autapses sur l'activité spontanée doivent être amplifiées par leur caractère systématique dans les réseaux d'architecture contrôlée.

1.2.3. Libération spontanée de glutamate

L'analyse des courants miniatures en présence de TTX (0.5 μ M) montre que la fréquence moyenne des événements miniatures (entre 30Hz et 50Hz) dans un réseau avec une dizaine de neurones est plus élevée que pour une autapse (entre 5Hz et 35Hz). Mais la fréquence moyenne des miniatures n'augmente pas linéairement avec le nombre de neurones. Si cette quantité reflète le nombre de synapses actives, cela suggère que le nombre de synapses par neurone n'augmente pas plus d'un facteur 2 dans les réseaux par rapport aux autapses.

Les amplitudes moyennes des miniatures dans les réseaux à 3 semaines sont de l'ordre de 25pA, tout comme dans les autapses entre 2 et 4 semaines. L'amplitude moyenne des événements miniatures semble donc être un paramètre régulé de manière homéostasique. Alors que la fréquence moyenne peut varier dans une grande gamme, et que les distributions d'amplitude peuvent avoir une queue de distribution très variable.

Conclusion

A trois semaines, l'architecture des réseaux de neurones d'architecture contrôlée avec moins de 20 % de neurones GABAergiques repose sur une organisation récurrente de l'excitation et de l'inhibition du fait de la présence d'autapses et de la forte connectivité qui s'opère de proche en proche. La connectivité synaptique n'est pas strictement contrôlée mais montre un gradient avec la distance fonctionnelle entre neurones, si bien que la connectivité est favorisée entre les premiers voisins par rapport aux suivants.

2. Mécanismes synaptiques mis en jeu dans l'initiation et la maintenance de l'activité spontanée des réseaux excitateurs

2.1. La libération spontanée de glutamate est nécessaire à l'initiation de l'activité spontanée dans les réseaux excitateurs

Dès deux semaines, l'activité collective dans l'autapse glutamatergique comme dans tous les réseaux d'architecture contrôlée d'une dizaine de neurones est supprimée par le CNQX (100 μ M) montrant *i*) que ce sont les neurones glutamatergiques qui génèrent l'activité spontanée comme ce qui a été observé dans les cultures de neurones du cortex ou de l'hippocampe (Bacci et al., 1999; Opitz et al., 2002) ; *ii*) qu'à ce stade l'initiation de l'activité spontanée requiert la libération spontanée de glutamate. En culture dans ces petits réseaux à l'instar de ce qui est observé en tranche (Cohen and Miles, 2000), on n'observe pas de cellules à la décharge autonome quand la transmission glutamatergique est bloquée.

2.1.1. Autapses

Dans le cas des autapses, il avait déjà été observé que l'activité nécessitait le bruit synaptique (Bacci et al., 1999). Nous avons montré que les cellules qui déchargent spontanément étaient caractérisées par des fréquences et des amplitudes des événements miniatures plus élevées. En particulier, ces cellules se distinguent des cellules silencieuses par la fréquence des événements de grande amplitude (de 100pA à 300pA) qui arrivent environ toutes les 100s. L'origine de ces événements de grande amplitude dans les autapses est mal connue (Xu-Friedman and Regehr, 2000). Ces événements ne sont pas caractérisés par un temps de montée long, ce qui montre qu'ils ne résultent pas de la sommation d'événements multiples. Leur basse fréquence est compatible avec un scénario où un événement unique de grande amplitude déclenche seul le premier potentiel d'action d'une bouffée qui fait rentrer la cellule dans un état d'activation auto-entretenu.

2.1.2 Réseaux

Dans les réseaux d'une dizaine de neurones comme dans les cultures standard, l'activité nécessite le bruit synaptique (Robinson et al., 1993). Vu les fréquences plus élevées de miniatures (30-50Hz) et leur amplitude moyenne qui est similaire à celle des événements enregistrés dans les autapses, l'initiation de l'activité spontanée pourrait reposer sur la sommation d'événements multiples. On observe en particulier une augmentation de la

fréquence des bouffées de potentiels d'action avec le nombre de neurones excitateurs dans le réseau, ce qui est compatible avec l'idée que l'augmentation de neurones dans le réseau augmente la fréquence des miniatures, donc la probabilité de sommation des événements miniatures et en conséquence, la probabilité d'initier une bouffée. Ces observations sont corroborées par des observations dans les cultures corticales où la fréquence des bouffées excitatrices augmente avec l'âge de la culture et la densité en synapses (Muramoto et al., 1993; Maeda et al., 1995).

Les valeurs de la fréquence moyenne (30-50Hz) et de l'amplitude moyenne des miniatures (mEPSC de 20pA, soit un mEPSP de 2mV environ) dans les réseaux d'architecture contrôlée sont proches de ce qui est reporté dans le cortex après une application locale de TTX *in vivo* (2-5mV ; 20-40Hz (Pare et al., 1997)). Les résistances membranaires des cellules en culture à trois semaines (~100MΩ) sont en revanche deux fois supérieures à celles reportées dans le cortex (~50MΩ, (Pare et al., 1997)). L'importance des événements miniatures dans le déclenchement de l'activité *in vivo* pourrait être sous estimée, en particulier dans le cas des neurones inhibiteurs qui sont caractérisés par une résistance membranaire plus grande et pour lesquels il a été montré dans le cervelet qu'un événement miniature pouvait déclencher un potentiel d'action (Carter and Regehr, 2002).

Conclusion

L'initiation de l'activité spontanée est donc principalement conduite par la libération spontanée de glutamate dans les neurones de l'hippocampe isolés ou formant des réseaux d'une dizaine de neurones¹⁵.

2.2. Mécanismes de maintenance de l'activité spontanée sous forme de bouffées

2.2.1. Cellule glutamatergique isolée : Rôle des différentes composantes synaptiques dans la maintenance de l'activité

La persistance de l'activité est nécessaire pour la mémoire de travail dans le cortex préfrontal et a lieu avec des fréquences assez basses (10Hz *in vivo*, (Wang, 2001)). Cette constatation pose un problème théorique : comment la dynamique des synapses excitatrices supposée être à l'origine de la persistance peut-elle sous-tendre l'activité à des fréquences

¹⁵ Les cellules GABAergiques isolées déchargent aussi de façon autonome, mais nous n'avons pas étudié les mécanismes qui sous-tendent leur activité spontanée.

aussi basses ? Dans un modèle de réseaux de neurones excitateurs, il a été montré que la cinétique de la composante la plus lente de la réponse synaptique détermine les intervalles de temps maximums entre potentiels d'action, donc la fréquence de décharge minimale de maintenance de l'activité (Wang, 2001). J'ai utilisé l'autapse glutamatergique comme le modèle le plus simple de réseau excitateur synchrone. Ce modèle comporte l'avantage que l'on peut enregistrer toute l'activité émise par le réseau et que l'activation des synapses est synchronisée sur le potentiel d'action. On peut ainsi distinguer différentes composantes synaptiques par leur cinétique et analyser leur rôle dans la maintenance de l'activité.

La concordance entre l'évolution de la fréquence de décharge et les caractéristiques de l'EPSP (amplitude croissante, cinétique plus lente) entre 2 et 4 semaines *in vitro* suggère que les propriétés synaptiques déterminent effectivement la gamme de fréquence dans laquelle le neurone isolé décharge.

Activation indispensable des récepteurs AMPA

Entre 2 et 4 semaines en culture, la maintenance de l'activité nécessite l'activation des récepteurs AMPA car en présence de CNQX, l'activité ne persiste pas après la stimulation d'un potentiel d'action en configuration cellule attachée.

L'activation du récepteur NMDA joue en revanche des rôles plus subtils dans le maintien de l'activité en fonction du stade de maturation des cellules.

Rôle du récepteur NMDA dans la persistance de l'activité à basse fréquence (~10Hz)

Les cellules âgées de 2 semaines sont caractérisées par un EPSP d'assez faible amplitude et une réponse synaptique dominée par la cinétique de la libération synchrone de glutamate activant des récepteurs AMPA et NMDA post-synaptiques. Nous avons montré qu'à ce stade, l'activation du récepteur NMDA était nécessaire pour que l'activité persiste après un premier potentiel d'action. L'activation du récepteur permet le maintien d'une activité de type bouffée avec des fréquences supérieures à 10Hz (100ms) concordant avec la cinétique du récepteur.

Dans les cellules matures, la suppression de l'activation du récepteur NMDA par l'APV-MK801 n'a pas le même effet. L'activité spontanée se maintient mais avec des intervalles longs et irréguliers. On ne peut plus distinguer les bouffées caractéristiques de ce stade. L'activation du récepteur NMDA permet donc de former des bouffées régulières mais n'est pas absolument nécessaire alors pour que l'activité se maintienne.

Ces observations expliquent certains résultats obtenus en culture : i) la diminution de la sensibilité de l'activité de neurones corticaux à la concentration en Mg^{++} avec l'âge de la culture (Maeda et al., 1995), ii) l'observation d'oscillations synchronisées qui sont indépendantes de l'activation du récepteur NMDA (induites par le blocage des canaux K^+ avec l'4-aminopyridine (Wang and Gruenstein, 1997), ou induites par la bicuculline, (Albowitz et al., 1997)) ; iii) le maintien d'une activité irrégulière quand les récepteurs sont bloqués dans des cultures d'hippocampe (Bacci et al., 1999).

En outre, on observe dans les cellules matures que la réponse autaptique est peu altérée par l'application d'APV-MK801 ce qui avait déjà été reporté par Goda et Stevens pour des hétéro-synapses entre paires de neurones à deux semaines en culture standard (Goda and Stevens, 1994). La comparaison de l'autapse avec les neurones en paire isolée suggère que l'autapse connaît une maturation de ses propriétés synaptiques similaires à celles des cellules en réseaux mais un peu plus tardive.

Le récepteur NMDA a donc un rôle différent en fonction de la maturation des cellules en culture : dans une cellule jeune, il permet la maintenance de l'activité après un premier potentiel d'action. Chez les cellules matures, il n'est pas nécessaire à la maintenance de l'activité mais à sa persistance sous forme de bouffées régulières de potentiels d'action.

Rôle d'une composante synaptique très lente dans la persistance de l'activité à très basse fréquence (~1-2Hz)

La décharge à basse fréquence d'une cellule à 3-4 semaines est supprimée par l'incubation des cellules en EGTA-AM (50 μ M, 15minutes). La cellule ne décharge alors plus que des potentiels d'action à des intervalles courts. Nous avons cherché le(s) mécanisme(s) sensible(s) à l'EGTA AM qui pouvait expliquer l'activité à basse fréquence des cellules matures contrôles et celle avec des intervalles irréguliers lorsque le récepteur NMDA est bloqué par l'APV-MK801. Pour cela, j'ai caractérisé la réponse autaptique d'une cellule mature. La réponse autaptique contrôle est caractérisée par un grand EPSP avec une composante continue dépolarisante très lente et des événements miniatures à haute fréquence, tous deux sensibles à l'EGTA AM. La composante continue est sensible dans la plupart des cellules à l'antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate, le MCPG. Dans certaines cellules, la composante résiduelle est abolie par la nifédipine qui bloque les canaux voltage dépendant à haut seuil de type L. Ces deux arguments suggèrent que la dépolarisation lente qui caractérise l'EPSP de ces cellules fait intervenir l'activation de la conductance cationique non sélective activée par le calcium, I CAN. Cette conductance a été mise en

évidence spécifiquement dans l'hippocampe (Congar et al., 1997) et aucun rôle physiologique n'a encore été décrit. Notre travail montre que I CAN, sous contrôle des récepteurs métabotropiques ou / et de l'activation des canaux calciques de type L, pourrait en effet jouer un rôle important dans la persistance de l'activité à des fréquences très basses.

Nous avons dit que des événements synaptiques miniatures étaient observées à haute fréquence pendant 500ms à 1s après un potentiel d'action ce qui suggère qu'il existe une libération vésiculaire retard de glutamate importante dans les cellules matures. L'incubation en EGTA-AM entraîne une suppression de l'augmentation de libération retard, tandis que l'EGTA dans la pipette ne la supprime pas. Les effets distincts de l'EGTA AM et de l'EGTA dans la pipette laissent penser que la concentration en calcium résiduel dans les terminaisons de l'autapse est responsable de l'augmentation des événements miniatures pendant 500ms-1s. Le calcium résiduel peut déclencher la libération retard de glutamate aux terminaisons et provoquer une augmentation de la fréquence des événements miniatures observés pendant une seconde. Une libération vésiculaire qualifiée de lente, retard ou asynchrone a déjà été observée lors de la maturation des neurones excitateurs hippocampiques en culture (Goda and Stevens, 1994; Cummings et al., 1996; Hagler and Goda, 2001) ou dans d'autres préparations (Atluri and Regehr, 1998).

Plusieurs arguments tendent à montrer que cette composante lente, sensible à l'EGTA AM et formée par l'activation de I CAN et la libération retard de glutamate, est à l'origine de la maintenance de l'activité à basse fréquence dans des autapses matures :

- 1) la cinétique de la composante lente (composée de I CAN ($\tau \sim 1s$) comme de la libération retard (500ms-1s)) correspond bien aux intervalles de temps privilégiés entre potentiels d'action dans une bouffée chez les cellules matures ;
- 2) l'irrégularité de la décharge des cellules matures par rapport à celle des cellules jeunes pourrait être associée à la nature stochastique de cette libération « retard » de glutamate. En présence d'APV-MK801, l'effet serait exacerbé.
- 3) L'EGTA-AM qui supprime principalement la composante lente continue et discrète en diminuant seulement de 30% la composante rapide agit de façon similaire à ce qui avait été observé (Cummings et al., 1996; Feller et al., 1996a). Son application : i) ne permet plus de voir d'activité spontanée avec des intervalles longs (>200ms) ; ii) diminue grandement la durée des bouffées spontanées¹⁶.

¹⁶ Ce dernier point pourrait aussi s'expliquer par une augmentation de la dépression synaptique à court terme en EGTA AM qui a déjà été observé Feller MB, Delaney KR, Tank DW (1996a) Presynaptic calcium dynamics at the frog retinotectal synapse. J Neurophysiol 76:381-400.. Cet effet est peu probable, car je n'ai pas constaté

La composante lente dépendante du calcium intracellulaire maintient la décharge d'une autapse avec des intervalles de temps longs (entre 200ms à 1 seconde). A partir de ces observations, on peut se demander pourquoi l'augmentation de l'amplitude de l'EPSP et de sa constante de temps entraîne une décharge à basse fréquence chez les cellules matures.

Dans une cellule mature, une estimation grossière du nombre de vésicules libérées de façon synchrone à partir de la comparaison de l'aire des miniatures et de l'aire de l'EPSC (intégré entre 0 et 200ms) suggère que les autapses matures à 3 semaines forment entre 500 et 5000 synapses qui libèrent simultanément. Nous avons décrit le rôle de composantes synaptiques lentes dans la maintenance de l'activité spontanée. Il faut comprendre pourquoi une cellule mature qui libère globalement plus de glutamate (et reçoit un EPSP de plus grande amplitude et plus lent), décharge à une fréquence plus basse (1-2Hz). Dans ces cellules uniquement, une période réfractaire de 150ms environ est observée, où aucun potentiel d'action ne peut être déclenché. Vu la grande amplitude des EPSPs chez les cellules matures, il est très possible que l'inactivation des canaux sodiques du potentiel d'action joue un rôle important dans l'établissement de cette période réfractaire. Mais on remarque aussi que pendant cette période réfractaire, la résistance de la cellule est diminuée de moitié (voir l'amplitude de l'artefact de stimulation dans la Fig.III-9C) ce qui suggère que des conductances sont activées.

Des fréquences de décharge spontanées assez élevées (10Hz) ne sont observées que dans les cellules jeunes avec un EPSP d'amplitude plus faible, ou dans les cellules matures incubées en EGTA-AM pour lesquelles le calcium intracellulaire est tamponné. Cela suggère que dans les cellules matures, l'EPSP de grande amplitude permet l'entrée de calcium par les canaux calciques dépendant du potentiel (de type L, (Bacci et al., 1999)), ce qui provoque l'activation des canaux potassiques de l'hyperpolarisation lente (sAHP, slow After HyperPolarisation, (Hotson and Prince, 1980)). Ce couplage de l'EPSP et de la sAHP a déjà été observé dans l'hippocampe (Lancaster et al., 2001). De même, il a été observé dans les terminaisons du motoneurone de la grenouille une libération massive de neurotransmetteurs

d'augmentation particulière de la dépression à court terme dans les cellules chargées en EGTA AM. Il a été observé dans les cultures de neurones de l'hippocampe que lors d'un train de potentiels d'action en présence d'EGTA AM, la dépression est parfois augmentée. L'effet est néanmoins surtout observé pour les premiers potentiels d'action Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85:2324-2334.. En effet, après environ 5 potentiels d'action à 5Hz par exemple, la transmission synchrone atteint une valeur plateau, qui devient égale ou plus élevée à celle des conditions contrôle après une vingtaine de potentiels d'action Cummings DD, Wilcox KS, Dichter MA (1996) Calcium-dependent paired-pulse facilitation of miniature EPSC frequency accompanies depression of EPSCs at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci* 16:5312-5323, Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85:2324-2334..

après un train de potentiels d'action, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire pourrait amplifier ce couplage en impliquant les récepteurs à la ryanodine (Akita and Kuba, 2000). Dans ce schéma qui ne reste qu'une hypothèse, une différence majeure entre les cellules isolées hippocampiques jeunes et matures (avec une période réfractaire inhabituelle) résiderait dans le fait que l'EPSP autaptique est suffisamment grand et provoque une période réfractaire : directement en diminuant la résistance membranaire (effet de shunt), et indirectement en activant massivement des canaux calciques voltage dépendant de type L qui induisent une grande AHP.

Une deuxième différence entre cellules jeunes et matures pourrait résider dans la présence de la conductance I CAN, ou des récepteurs métabotropiques dans les cellules matures.

Conclusion

Notre étude dans une cellule glutamatergique révèle que l'activité peut se maintenir à basse fréquence grâce à des mécanismes synaptiques de cinétique lente.

L'activation du récepteur NMDA est nécessaire pour maintenir de l'activité dans des cellules avec une autapse petite et rapide, tandis que dans des cellules matures avec un EPSP plus grand, elle semble jouer un rôle dans le maintien de l'activité sous forme de bouffée.

Dans ces cellules matures, une composante très lente apparaît qui est sensible au tamponnage du calcium par l'EGTA AM. Cette composante lente semble résulter de l'activation du courant I CAN activés par les récepteurs métabotropiques du glutamate sur lequel se surimpose des événements miniatures dits asynchrones.

Dans l'hippocampe en tranche, la terminaison des bouffées de potentiels d'action est généralement attribuée à la déplétion présynaptique en vésicules (Staley et al., 1998) qui conduit en culture à l'observation de période réfractaire après une bouffée de potentiels d'action (Maeda et al., 1995; Harris et al., 2002b). Or, à l'inverse de la libération synchrone qui diminue dans un train de potentiels d'action, la libération de glutamate « retard » dite asynchrone augmente au contraire au cours d'un train, si bien que les deux processus, synchrone et asynchrone, évoluent de façon complémentaire maintenant une charge évoquée totale (synchrone + asynchrone) constante (Cummings et al., 1996; Hagler and Goda, 2001). Dans les conditions où elle peut déclencher un potentiel d'action post-synaptique, la libération asynchrone pourrait donc assurer un mécanisme de persistance de l'activité qui compenserait la dépression synaptique de la composante synchrone lors d'un train de potentiels d'action.

Dans les paires de cellules

Les paires de cellules glutamatergiques isolées s'activent de façon synchrone dans une fenêtre de 20ms, l'activation d'une des 2 cellules entraîne toujours sa partenaire. Leurs décharges de type bouffées / silences avec des fréquences lentes rappellent beaucoup celles des autapses. La composante synaptique lente calcium dépendante pourrait aussi expliquer la maintenance de l'activité à basse fréquence (1Hz) dans les cellules matures. En effet, elle est aussi observée au niveau des hétéro-synapses des paires de neurones isolées, en particulier lors d'une bouffée spontanée de potentiels d'action dans une des cellules. L'évolution similaire des caractéristiques de la décharge spontanée des paires et de l'autapse et l'effet de suppression des intervalles longs par l'incubation en EGTA-AM suggèrent que la composante lente calcium dépendante pourrait aussi permettre une décharge lente dans les cellules matures des paires de neurones.

2.2.3. Mécanismes synaptiques et de réseaux dans les réseaux pluricellulaires

L'ensemble des neurones d'un réseau excitateur génère spontanément des bouffées séparées par de longs silences collectifs (de l'ordre de 500ms à une seconde) similaire à ce qu'on observe pour une autapse glutamatergique. Cela suggère que dans les réseaux des composantes lentes (NMDA, récepteurs métabotropiques du glutamate activant I CAN, libération retard de glutamate) contribuent au maintien de l'activité à très basse fréquence.

Nous avons vu qu'avec le nombre de neurones qui augmentent dans le réseau, l'activité est moins synchrone. En particulier au cours d'une bouffée, elle tend à se désynchroniser. Dans les réseaux excitateurs, il apparaît de très longs silences pour certains neurones et l'activité peut persister au niveau de petits groupes (paires ou triplets) localisés et se maintenir grâce à l'activation du reste du réseau par ces petits groupes. La maintenance de l'activité semble donc faire intervenir aussi des mécanismes de propagation.

Conclusion

Dans les autapses comme dans les hétéro-synapses des paires de cellules, les propriétés pré et post synaptiques lentes suffisent à entretenir l'activité à de basses fréquences. Dans les réseaux avec une dizaine de neurones, le maintien de l'activité met aussi en jeu des mécanismes de réverbération qui s'observent par la propagation de l'excitation entre groupes de cellules.

3. Lien entre l'architecture fonctionnelle d'un réseau et les motifs de l'activité spontanée qu'il génère

Des observations anatomiques permettent d'estimer que dans le cortex, les cellules pyramidales font jusqu'à 8000 synapses avec les autres neurones. Les cellules pyramidales ont de très nombreux partenaires. En revanche, le nombre de synapses formées entre deux neurones est faible, de l'ordre de 1 à 5 synapses (Gabbott et al., 1987). Dans nos réseaux, les neurones ont de fait moins d'une dizaine de partenaires. Et à l'inverse ils sont très fortement connectés entre eux : ils forment des synapses sur eux-même et sur leurs voisins selon un gradient décroissant avec la distance « fonctionnelle » dans le réseau (voir chapitre I). Qu'y a-t-il de commun entre ces micro-réseaux d'architecture contrôlée *in vitro* et les structures cérébrales telles que le cortex ou l'hippocampe ?

D'une part, les réseaux d'architecture contrôlée de petite taille comme les préparations *in vitro* d'hippocampe (Cohen and Miles, 2000) ou de cortex (Sanches-Vives and McCormick, 2000) sont spontanément actifs. Ils ont des proportions similaires en neurones inhibiteurs (5-20%), et surtout ils sont caractérisés par une grande excitation récurrente.

Bien que la structure soit très différente dans nos systèmes en culture et *in vivo*, on peut supposer que les mêmes règles de développement dépendant de l'activité sont à l'œuvre dans les différents systèmes. Essayons d'utiliser les avantages de notre préparation (contrôle de paramètres structuraux et suivi de l'activité de *tous* les neurones) pour tirer des informations sur les relations qui se mettent en place spontanément entre l'architecture fonctionnelle d'un réseau et l'activité qu'il génère.

3.1. Les oscillations synchrones : le motif commun de l'excitation récurrente

Les réseaux excitateurs ont la même dynamique épilepticoïforme de type bouffées de potentiels d'action / silence. D'une cellule isolée à un réseau de 10 neurones, ces motifs sont conservés malgré le nombre total de neurones dans le réseau, la connectivité et les propriétés intrinsèques de chaque neurone qui varient puisque les neurones sont prélevés dans tout l'hippocampe. Ainsi dans un réseau ultra-synchrone comme l'autapse ou fortement synchrone comme la paire de neurones glutamatergiques, le réseau n'a que deux états : un état de repos et un état d'activation auto-entretenu où il génère des bouffées de potentiels d'action à une fréquence assez bien définie. Les motifs de l'activité spontanée se résument alors aux bouffées de potentiels d'action synchrones à 20ms et entrecoupées de longs silences. Dans les réseaux excitateurs de plus grande taille où les connexions sont très récurrentes via des

contacts synaptiques des neurones sur eux-mêmes et entre neurones de proche en proche, on retrouve les mêmes motifs de l'activité : bouffées / silence.

Comme dans les réseaux immatures évoqués dans l'introduction (Feller et al., 1997; Garaschuk et al., 1998; O'Donovan et al., 1998; Wong, 1999; Harris et al., 2002b), il apparaît qu'un réseau exciteur d'architecture contrôlée composé de connexions fortement récurrentes montre de façon reproductible une dynamique de type bouffées - silences. Cette dynamique correspond à un état d'activation collective, stable et auto-entretenu.

3.2. Emergence d'assemblées de neurones glutamatergiques synchrones

On observe une caractéristique nouvelle dans les réseaux de neurones excitateurs qui comportent une dizaine de neurones : des assemblées de neurones fortement synchrones comportant 2 à 4 neurones émergent. Ces neurones sont en général voisins et donc forment des synapses réciproques entre eux avec une grande probabilité dans le réseau.

3.3. Circuits d'inhibition locaux

Notre étude met en évidence des actions communes à tous les neurones GABAergiques sur l'activité des neurones glutamatergiques dans les réseaux d'architecture contrôlée *in vitro*. Les neurones inhibiteurs augmentent la diversité des profils de décharge et des états d'activation, et assurent la segmentation d'assemblées synchrones et diminuent localement le niveau d'activité¹⁷.

Diversification des motifs de l'activité spontanée des neurones excitateurs

Nous avons vu que les neurones inhibiteurs sont à l'origine d'une grande diversité de motifs dans la dynamique de l'activité spontanée du réseau. La complexité de la dynamique des réseaux comprenant des inhibiteurs se traduit par l'apparition de potentiels d'action isolés, des longs silences à l'intérieur des bouffées de potentiels d'action et de bouffées de potentiels d'action qui ne font plus intervenir qu'une fraction des excitateurs du réseau. Leurs effets sont d'autant marqués qu'ils sont représentés en grand nombre dans le réseau.

¹⁷ Leur action de modérateurs de l'activité sur leurs voisins n'est pas systématiquement associée à la détection de potentiels d'action dans les cellules GABAergiques. Cette observation pourrait s'expliquer par la moins bonne détection des potentiels d'action à partir du signal de fluorescence dans les cellules GABAergiques et demande donc à être confirmée par des expériences de double patch des neurones GABAergiques et de leurs voisins. Néanmoins, l'estimation de l'activité des cellules GABAergiques par le patch clamp en configuration cellule attachée a toujours confirmé l'estimation obtenue à partir de l'imagerie calcique au niveau des distributions des ISIs. Si l'estimation de l'activité des cellules GABAergiques par l'imagerie calcique est juste, cela suggère que la libération spontanée de GABA par les neurones GABAergiques puisse suffire à hyperpolariser leurs voisins. Cet effet pourrait être aussi une caractéristique des systèmes de culture dotés d'une grande synaptogénèse.

Définition des assemblées synchrones

La présence de neurones GABAergiques dans les réseaux principalement excitateurs diminue la corrélation d'activité entre les neurones glutamatergiques mais n'empêche pas la constitution d'assemblées synchrones stables. Dans les réseaux comprenant 10% de neurones inhibiteurs, les corrélations à $t = 0$ maximales de l'activité entre neurones glutamatergiques peuvent dépasser les valeurs observées dans des réseaux purement excitateurs. En outre, la position des neurones GABAergiques semble importante pour déterminer les neurones qui constituent ces assemblées synchrones.

Un frein à l'excitation, une action locale

Les neurones GABAergiques ont pour effet localement de restreindre l'activation de leurs neurones voisins : i) en diminuant leur fréquence de décharge et en faisant apparaître de longs silences ; ii) en empêchant leur recrutement dans des assemblées de neurones synchrones en particulier lors de bouffées collectives. L'action systématique de la bicuculline sur les bouffées collectives montrent qu'ils constituent un frein à l'excitation réverbérante collective et à sa propagation dans le réseau.

3.3.1. Inhibition récurrente disynaptique

Les neurones inhibiteurs ont un effet quasi-systématique sur les neurones excitateurs par une action locale de modération de l'activité de leurs premiers voisins, dont ils diminuent l'activité et les corrélations avec les autres neurones du réseau. A trois semaines on observe en immunocytochimie qu'ils forment des contacts sur l'ensemble des neurones excitateurs du réseau (voir Fig.IV-3). Néanmoins il est possible qu'ils forment plus de contacts sur les neurones voisins et montreraient toujours une action locale, indépendamment de leur type.

3.3.2. Contrôle des assemblées synchrones par des neurones GABAergiques

Dans les réseaux de neurones dont un neurone est inhibiteur au moins, des sous-assemblées de neurones synchrones se forment. Leur définition dépend de la position relative des neurones excitateurs qui la constituent et de leur position par rapport au(x) neurone(s) inhibiteur(s).

3.3.3. Contrôle global par les inhibiteurs

A l'échelle du réseau, les neurones GABAergiques ont une action globale de diversification de la dynamique et de modération de l'activité. On peut voir, en immunocytochimie en marquant la GAD, qu'ils forment en général des contacts sur tous les corps cellulaires des autres neurones du réseau. Dans les réseaux qui comprennent au moins un neurone inhibiteur, la dynamique de l'ensemble du réseau est nettement enrichie : des bouffées de potentiels d'action alternent avec des potentiels d'action uniques et des bouffées à des fréquences plus variées. Parallèlement les états d'activation du réseau ne sont plus uniquement collectifs mais se multiplient : des groupes de cellules synchrones peuvent s'activer de façon alternée sans que l'ensemble du réseau se synchronise. Certains neurones isolés montrent de grands silences ou des bouffées autonomes de façon indépendante du reste du réseau. Ces effets sont clairement dus à la présence de neurone(s) inhibiteur(s) puisque dans un réseau qui comprend un inhibiteur, la bicuculline inverse le phénomène en faisant retrouver au réseau des motifs de type bouffée-silence, avec un état d'activation collective privilégié. Comme pour les réseaux matures en tranches, les réseaux fermés en culture développent donc spontanément des circuits unitaires locaux excitateur / inhibiteur : le neurone inhibiteur et son premier voisin gardent toujours ce type d'interaction.

Conclusion :

Ségrégation en unités de contrôle composées de quelques neurones

L'observation de neurones GABAergiques qui inhibent et de réseaux glutamatergiques qui ont des décharges épileptoïformes pourrait paraître commune. Pourtant, il me semble qu'il y a deux points assez surprenant dans les caractéristiques observées dans la dynamique des réseaux : leur robustesse et la segmentation du réseau en petites unités de quelques neurones. Notre approche occulte la diversité des types cellulaires inhibiteurs et excitateurs qui sont multiples dans l'hippocampe et caractérisés par des propriétés de libération et des propriétés intrinsèques spécifiques. Néanmoins, on voit que les réseaux de neurones mettent en place une dynamique très reproductible.

Cela suggère qu'il existe certains mécanismes de régulation qui sont mis en jeu lors du développement pour assurer cette constance des motifs collectifs de l'activité en fonction de l'architecture et de la segmentation en petites unités de contrôle. L'émergence de petites assemblées synchrones pourrait rappeler la dynamique d'ensembles synchrones dans le cortex (Cossart, et al. 2003).

4. Règles opérant pendant le développement

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'activité électrique spontanée peut façonner l'élaboration des synapses entre neurones lors du développement avant toute expérience sensorielle. Réciproquement tout semble montrer que l'organisation des synapses va déterminer l'activité spontanée. Essayons de dégager dans les réseaux de neurones d'architecture contrôlée, certaines règles de développement des synapses entre neurones dans le réseau et de les lier à la dynamique de l'activité spontanée.

4.1. Connectivité de proximité

On observe dans les réseaux un gradient de connectivité (voir chapitre I) qui favorise les connexions récurrentes autaptiques et de proche en proche. Par ailleurs, nous avons vu que dans ces réseaux des petites structures étaient synchrones. Vraisemblablement, les cellules fortement connectées sont synchrones dans les bouffées. On peut suggérer que la modulation de l'efficacité des synapses en fonction du timing des potentiels d'action pré et post synaptiques rentrent en jeu dans le développement (Bi and Poo, 1998; Bi and Poo, 1999). Cette règle conduit à un mécanisme positif de renforcement des connexions entre neurones synchrones qui pourrait expliquer les assemblées de neurones synchrones qui se forment localement dans le réseau. Néanmoins la plasticité dépendante du timing entre les potentiels d'action pré et post synaptique ne permet pas d'expliquer à elle seule l'observation que le niveau d'activité reste environ constant dans les réseaux excitateurs indépendamment de leur taille. Par exemple, les autapses ont une dynamique spontanée proche de celle des réseaux de 10 neurones, avec des bouffées eux fois moins fréquentes environ.

4.2. Homéostasie

Plusieurs paramètres ne dépendent pas du nombre de neurones : l'amplitude moyenne des courants miniatures synaptiques (autour de 20pA), le niveau d'activité moyen (autour de 0,2-0,4Hz), la fréquence des événements miniatures spontanés (entre 3 et 30Hz). Cela suggère que des mécanismes assurent, indépendamment du nombre de neurones en présence, une forme d'homéostasie (Turrigiano et al., 1998). L'homéostasie des propriétés synaptiques (fréquences et amplitude) et l'initiation dépendant de la libération spontanée pourrait expliquer la remarquable stabilité du niveau d'activité des réseaux dont le nombre de neurones constitutifs est très variable.

Conclusion

A partir des réseaux d'architecture contrôlée, nous avons observé des principes reproductibles d'activation spontanée des réseaux de neurones hippocampiques récurrents : la segmentation du réseau en groupes de neurones excitateurs synchrones et l'apparition de circuits locaux d'inhibition. Les propriétés intrinsèques de la cellule que nous avons négligées pour notre étude et les propriétés de connectivité de ces cellules peuvent être à l'origine de la diversité d'activation des neurones inhibiteurs. Mais nous avons vu que l'estimation de l'activation des neurones inhibiteurs était limitée par la cinétique du calcium dans ces cellules (Lee 2000). Pour aborder la diversité des rôles des neurones inhibiteurs et enregistrer tous les neurones du réseau, des techniques telles que les MEAs sont nécessaires et permettront de stimuler et d'enregistrer les neurones simultanément (voir Annexe 2).

CONCLUSIONS

Avec tous les membres de l'équipe de Didier, en particulier Catherine Herr et Laurent Bourdieu, j'ai contribué au développement d'un nouveau système de culture où la position des neurones est localisée, les neurites guidées et la connectivité entre cellules orientée. Je pense que cette technique est propice au suivi du développement neuronal à long terme, et en particulier pour étudier le rôle joué par l'activité électrique.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé cette technique pour construire des réseaux de neurones d'architecture variable et très différente de la structure de l'hippocampe dans le cerveau intact. Néanmoins cette approche soulève des mécanismes nouveaux. Elle a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes qui peuvent jouer des rôles dans la dynamique de l'activité spontanée *in vivo* mais sont difficiles à aborder expérimentalement :

- 1) les événements miniatures glutamatergiques peuvent en culture initier l'activité spontanée ;
- 2) plusieurs composantes lentes peuvent permettre le maintien de l'activité dans l'hippocampe impliquant : le récepteur ionotropique NMDA du glutamate assurant une persistance vers 10Hz, les récepteurs métabotropiques du glutamate permettant via l'activation de I CAN une persistance autour de 0,5-1Hz ;
- 3) la libération retard de glutamate semble en outre pouvoir relancer l'activité dans notre système, comme le montre la variabilité engendrée lorsque la composante NMDA est bloquée ;
- 4) L'étude des réseaux a confirmé qu'indépendamment du nombre de neurones, l'activité spontanée de réseaux excitateurs récurrents est dominée par des oscillations synchrones similaires à ce qui est décrit dans les systèmes immatures.
- 5) les neurones GABAergiques (inhibiteurs à ce stade) jouent des rôles fondamentaux et très conservés dans le contrôle de l'activité collective des neurones excitateurs qui les entourent : diversification de la dynamique individuelle et collective, segmentation d'assemblées de neurones synchrones.
- 6) les neurones inhibiteurs se montrent capables d'exercer un contrôle local sur leur neurone voisin excitateur immédiat.

Les neurones des réseaux d'architecture contrôlée évoluent ensemble *in vitro* dans un système fermé. La correspondance entre l'organisation de la connectivité et celle de la co-activation des neurones ainsi que le niveau stable d'activité suggère que des mécanismes de plasticité et d'homéostasie soient mis à l'œuvre dans leur développement.

ANNEXE 1

CARACTERISTIQUES DES NEURONES INHIBITEURS

A1.1. Dans un réseau exciteur

Une lente cinétique du calcium intracellulaire

Nous avons observé que le signal de fluorescence du Fura 2 des cellules inhibitrices était souvent caractérisé par i) un marquage plus faible qui peut s'expliquer par leur plus petit volume en général ; ii) une dynamique plus lente que les neurones excitateurs lors d'une bouffée de potentiels d'action (voir Fig.1B).

Ainsi on observe que les temps caractéristiques de la montée et de la descente des transitoires calciques sont plus grands dans les cellules inhibitrices (comparer les cinétiques des deux cellules inhibitrices 1 et 3 avec celles des cellules excitatrices du réseau dans la figure A1-1B). Cette observation a déjà été faite dans les neurones de l'hippocampe mis en culture par le groupe de Neher (Lee et al., 2000) : leur travail a montré que la constante de liaison du calcium par les tampons endogènes κ_S était plus élevée dans les cellules inhibitrices que dans les cellules excitatrices (voir chapitre II). Compte tenu du fait que nous fondons notre analyse de l'activité spontanée sur l'imagerie du calcium intracellulaire, notre estimation de la décharge des neurones inhibiteurs pourrait y être biaisée. Des enregistrements électrophysiologiques en configuration cellule attachée des neurones inhibiteurs ont cependant conforté mes résultats obtenus via l'imagerie calcique (comparer les histogrammes A et C2 de la figure V-1 et les histogrammes B2 et C2 avec E1 et F1 de la figure V-14).

Avant d'analyser les effets des cellules inhibitrices sur la dynamique des neurones excitateurs, nous allons caractériser l'activation des cellules inhibitrices lorsque le réseau est actif spontanément.

Dynamique de l'activité spontanée des cellules inhibitrices

Peu de potentiels d'action émis

Nous avons observé que les neurones inhibiteurs font moins de potentiels d'action que les excitateurs appartenant au même réseau. Compilés sur 10 réseaux de 5 à 13 neurones, les neurones excitateurs font en moyenne 4 potentiels d'action toutes les 10 secondes tandis que les neurones inhibiteurs en font 2 toutes 10 secondes (pour les excitateurs $0.42 \pm 1.6 \text{ s}^{-1}$, $n = 53$ et pour les inhibiteurs $0.21 \pm 1.45 \text{ s}^{-1}$, $n=9$). Cette caractéristique semble être associée avec la présence quasi-systématique d'une autapse inhibitrice.

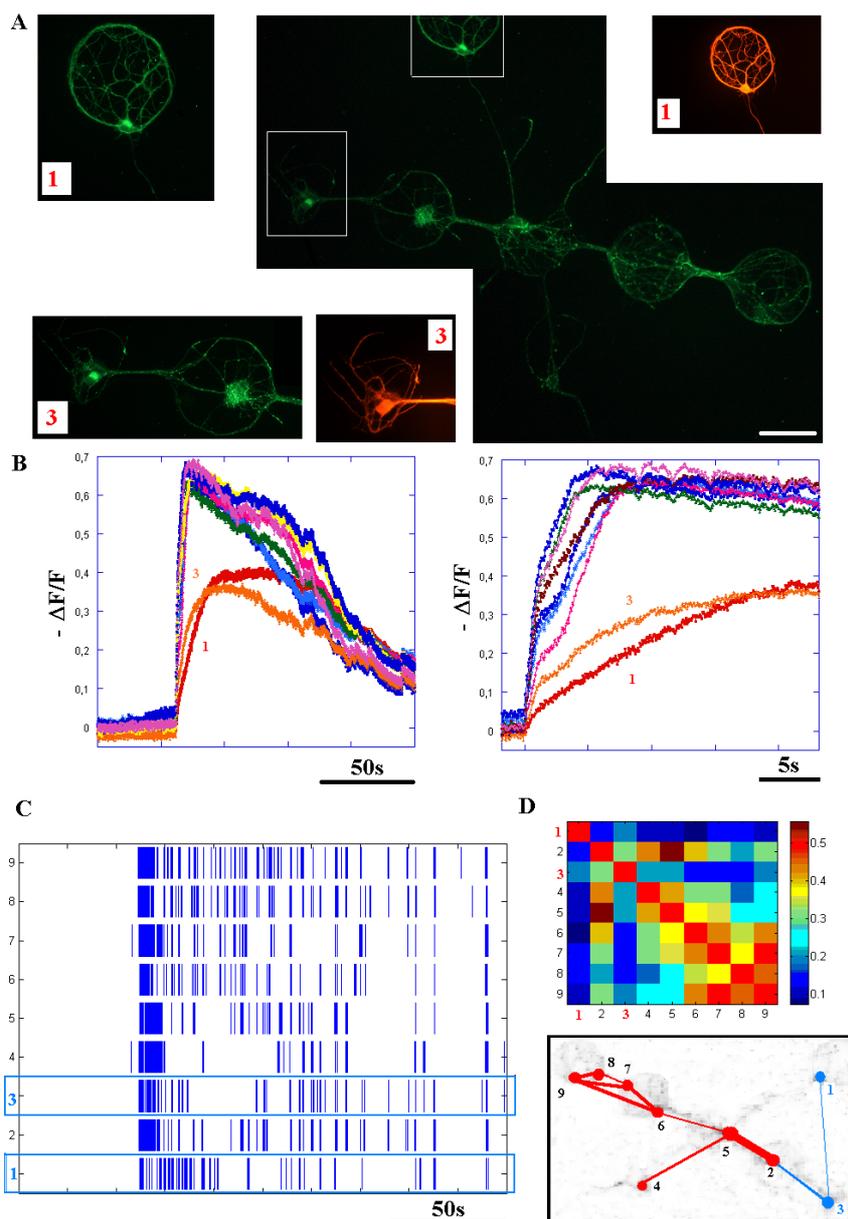


Figure A1-1. Identification et caractérisation des neurones inhibiteurs dans un réseau de neurones comportant 9 cellules et âgé de 19DIV. **A.** Le double marquage effectué avec des anticorps dirigés contre la GAD 65 (vert) et contre le GABA (rouge) met en évidence la présence de neurones inhibiteurs (1 et 3) dans le réseau. **B.** Lors d'une bouffée de potentiels d'action, les variations relatives de l'intensité de fluorescence F du Fura 2, représentée ici sous la forme de $-\Delta F/F$, révèlent la dynamique plus lente du calcium intracellulaire dans les neurones inhibiteurs. **C.** Estimation des potentiels d'action à partir du signal d'intensité de fluorescence du Fura-2. On observe pour certains neurones des périodes de grands silences (20-30s). A l'échelle du réseau, l'activité ne s'arrête pas plus de 5s environ. L'activité des deux neurones inhibiteurs est encadrée en bleu. **D.** La matrice de corrélation d'activité entre paires de neurones montre qu'aux deux neurones inhibiteurs sont associés les plus faibles coefficients de corrélation (0,1 à 0,3). L'épaisseur du trait qui lie deux neurones est représentative de leur coefficient de corrélation. On voit apparaître deux sous ensembles : le triplet constitué par les neurones 2,4 et 5 et le quadruplet constitué par les neurones 6,7,8 et 9. L'activité des neurones inhibiteurs 1 et 3 est peu corrélée avec le reste du réseau à l'exception de la corrélation entre 3 et 2 (coefficient de 0,31) et entre eux (coefficient de 0,18). Les sous-ensembles de neurones définis par les coefficients de corrélation des neurones deux à deux sont représentés en dessous sur le négatif de l'image de fluorescence obtenue avec un objectif 10x, et un regroupement des pixels 8x8. On constate que les deux inhibiteurs sont isolés chacun en fin d'une branche et que les sous réseaux excitateurs correspondent à deux zones géographiques distinctes.

Distributions des ISIs

Les distributions d'intervalles entre potentiels d'action des neurones inhibiteurs inférieurs à 5 s sont représentées dans la figure V-2A (bas). La distribution est caractérisée par un pic pour des intervalles compris entre 100ms et 500ms et une longue traîne. A titre de comparaison, les ISIs des neurones excitateurs dans des réseaux purement excitateurs (RE, haut de la Fig.2A) ou dans des réseaux avec inhibiteurs (REI, milieu de la Fig.2A) sont représentés dans la même figure entre 0 et 5s.

Une première différence entre neurones inhibiteurs et excitateurs réside dans le fait que les ISIs de 50ms sont pratiquement absents des distributions pour les neurones inhibiteurs. Pour nous assurer que cette différence n'était pas due à la différence de dynamique du calcium sur laquelle repose notre estimation des potentiels d'action, nous avons confirmé ce résultat par des enregistrements en configuration cellule attachée (Fig. 2C). Ces enregistrements ont précisé que l'intervalle de temps optimal entre potentiel d'action se situait entre 50 et 150ms pour un neurone GABAergique.

Pour comparer les distributions des neurones excitateurs et inhibiteurs obtenues à partir de l'estimation des potentiels d'action par le signal de fluorescence du Fura 2, nous avons réparti les intervalles en 3 catégories : de 0 à 500ms, de 500ms à 5s et au-dessus de 5s et comparer les fractions relatives de chaque catégorie (Fig. 2B). Pour des cellules excitatrices dans les réseaux avec ou sans neurones inhibiteurs, la majorité des ISIs (>58%) est inférieure à 500ms et les intervalles supérieurs à 5s constituent moins de 10% de la distribution. En revanche, dans les cellules inhibitrices, un peu plus de la moitié des ISIs est inférieure à 500ms et la queue de distribution correspondant à des ISIs supérieurs à 5s constitue plus de 30% de la distribution. Ainsi un potentiel d'action sur trois dans les cellules inhibitrices est émis après un intervalle supérieur à 5s.

Les neurones inhibiteurs sont donc caractérisés par une fréquence de décharge privilégiée (correspondant au pic de la distribution des ISIs) entre 5 et 20Hz et des périodes de silence (longs ISIs) peu observées dans les cellules excitatrices des mêmes réseaux. Cette observation est sûrement corrélée à la présence sur les cellules inhibitrices d'autapses inhibitrices que j'ai observé fréquemment dans les enregistrements en configuration cellule entière.

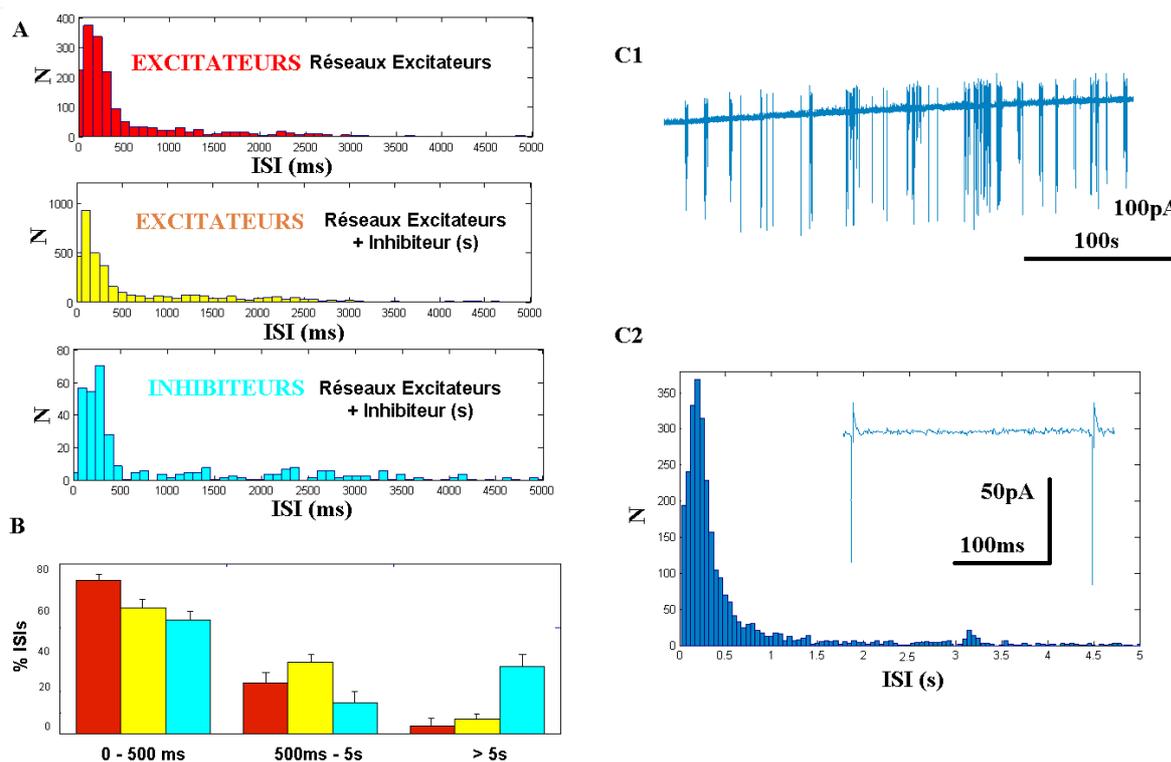


Figure A1-2. Distribution des ISIs des cellules excitatrices et inhibitrices dans les réseaux de neurones d'architecture contrôlée. **A.** Distribution des ISIs provenant de l'estimation des potentiels d'action à partir du signal de fluorescence du Fura-2 pour les cellules excitatrices des réseaux excitateurs purs ($n_{RE} = 7$, histogramme rouge) et des réseaux mixtes (histogramme jaune, 9 réseaux analysés). Les intervalles pour les neurones inhibiteurs des mêmes réseaux montrent la distribution bleu cyan (9 réseaux analysés). **B.** Pour chaque catégorie, la répartition des ISIs entre 0 et 500ms, 500ms et 5s, et supérieur à 5s. **C1.** La nature inhibitrice de la cellule est mise en évidence par la forme du potentiel d'action (voir l'encart C2), et est confirmée lors du passage en configuration cellule entière par la détermination du potentiel de réversion de la réponse synaptique. Un enregistrement de 300s est représenté ici pour une cellule âgée de 21DIV. **C2.** La distribution des ISIs (calculée pour une fenêtre de 50ms) de la cellule est constituée d'un pic vers 200ms et la majorité des intervalles est inférieure à 500ms. L'activité mesurée en imagerie calcique ou en patch clamp est donc similaire aux résultats obtenus par l'analyse du signal de fluorescence du Fura-2. Sur les 7 enregistrements de patch clamp en configuration cellule attachée de cellules inhibitrices dans des réseaux comportant une dizaine de neurones à 3 semaines, nous avons toujours observé un pic pour des valeurs comprises entre 500 et 150ms. En revanche, la queue de distribution variait en fonction du réseau. Il faut noter que nous n'avons pas accès dans les réseaux où le patch clamp a été réalisé au nombre total de neurones inhibiteurs.

Faible corrélation avec les autres neurones

En établissant les cartes de corrélation à $t = 0$ entre neurones, nous avons observé que les neurones inhibiteurs étaient toujours caractérisés par des coefficients de corrélation les plus faibles des neurones du réseau (voir les figures V-1D, 3C, 4C, 5C, 6D et 7D). Sur les neuf réseaux analysés, les neurones inhibiteurs avaient en moyenne un coefficient de corrélation à $t = 0$ de 0.27 ± 0.11 tandis que celui des neurones excitateurs des mêmes réseaux était de 0.43 ± 0.15 . Il arrive même que les coefficients de corrélation entre un neurone inhibiteur et son voisin excitateur soient nuls, c'est à dire que les deux neurones ont une activité décorrélée (voir neurones 1 et 2 dans la figure V-3).

Temps d'activation préférentiel lors d'une bouffée

Les neurones inhibiteurs ne s'activent pas en général en premier lors une bouffée collective mais sont actifs simultanément ou bien après des neurones excitateurs (exemples d'activation retard dans les Fig. V-5A, 6A et 8B et un exemple d'activation simultanée dans la figure V-7A2). Cette observation semble indiquer qu'ils sont stimulés par des neurones excitateurs mais ne déclenchent pas à eux seuls l'activité collective.

Au sein d'une bouffée, nous n'avons pas observé de règle systématique quant à l'activation des neurones inhibiteurs. Les neurones inhibiteurs s'activent parfois en retard dans une bouffée (Fig. V-4A1,A2,A3) ou seulement à la fin de la bouffée de potentiels d'action (Fig. V-3B). Néanmoins si la variabilité est grande d'un réseau à l'autre, il semble qu'au sein d'un même réseau, le comportement du (ou des) inhibiteur (s) à cet égard soit (soient) assez reproductible pour un même réseau. Cela suggère que les neurones inhibiteurs soient impliqués dans l'activité et jouent des rôles différents (en particulier dans la terminaison d'une bouffée) selon leur nature ou l'architecture du réseau.

Conclusion

Les neurones inhibiteurs sont en minorité dans les réseaux que nous avons considérés ici. Néanmoins plusieurs caractéristiques de leur dynamique les distinguent nettement des neurones excitateurs : (i) le peu de potentiel d'action émis, (ii) la distribution des ISIs dépourvue de temps courts (<50ms) avec des temps longs correspondant à de grands silences, (iii) une faible corrélation avec les autres neurones du réseau et (iv) ils ne sont jamais initiateurs d'une bouffée. Les caractéristiques (i) et (ii) peuvent s'expliquer par la présence d'une autapse inhibitrice importante dans les neurones inhibiteurs des réseaux d'architecture contrôlée. Examinons désormais si la dynamique des neurones excitateurs qui les entourent est modifiée en leur présence.

A1.2. Neurones GABAergiques isolés

Par notre approche couplée d'immunocytochimie et d'imagerie calcique, nous avons mis en évidence que les cellules GABAergiques isolées et privées d'entrées excitatrices génèrent entre 2 et 4 semaines en culture de l'activité spontanée (exemple d'autapse GABAergique, Fig. V-16A et estimation de l'activité à partir de l'imagerie calcique Fig. V-16 B1,B2 et C1,C2). Nous avons confirmé ces observations par l'enregistrement de 9 cellules inhibitrices spontanément actives en configuration cellule attachée (voir Fig. V-16 D2 et E2).

On peut dégager deux propriétés communes à l'activité spontanée de ces neurones GABAergiques : *i*) la grande durée des bouffées de potentiels d'action ($>100s$) ; *ii*) l'absence d'intervalles de temps courts ($<70ms$) et la présence d'intervalles de temps très longs ($>1s$) entre potentiels d'action ; *iii*) la présence fréquente d'un pic dans les distributions des intervalles de temps entre potentiels d'action correspondant à une fréquence de décharge privilégiée.

Les bouffées de potentiels d'action de ces cellules durent en général plus de 100s (en moyenne $140s \pm 50s$, voir Fig. V-16 *B1* et *C1* ; Fig. V-16 *D1*, *E1*). Elles sont donc bien plus longues que celles observées pour des autapses glutamatergiques.

Les distributions d'intervalles de temps entre potentiels d'actions (Fig. V-16 *B2* et *C2*) pour des cellules GABAergiques entre 2 et 4 semaines sont dépourvues d'intervalles courts (en dessous de 70ms). Les distributions ont un pic pour des intervalles compris entre 100 et 500ms et une longue traîne pour des intervalles plus longs. Avec l'âge, la queue de distribution s'étend vers des intervalles plus importants (comparer Fig. V-16 *B2* et *C2*, *D1* et *E1*).

La plupart des cellules à deux semaines ont déchargé à une fréquence de 3 à 15Hz (notons qu'une cellule avait une fréquence privilégiée de 0.25Hz) tandis qu'à quatre semaines, la fréquence privilégiée était comprise entre 1 et 2Hz ($n=2$). Une cellule à un mois a montré une décharge à fréquences caractéristiques, 10Hz et à 2Hz. Deux cellules à quatre semaines ne déchargeaient pas de façon régulière.

Conclusion

Les cellules GABAergiques isolées en culture sont donc capables de générer intrinsèquement de l'activité spontanée avec des intervalles de temps entre potentiels d'action longs et sur des durées de l'ordre de la minute sans interruption. Cette activité auto-entretenu montre souvent une fréquence privilégiée qui varie entre 10Hz et 0.25Hz. Ces cellules GABAergiques sont dotées *in vitro* d'un rythme propre intrinsèque qui diffère d'une cellule à l'autre. Les cellules GABAergiques à l'inverse des cellules glutamatergiques isolées peuvent générer spontanément une grande diversité de décharges : régulières, irrégulières et sous forme de bouffées. Cette observation rappelle la diversité de la décharge des interneurons observée dans les tranches de l'hippocampe (Parra et al., 1998). Les mécanismes d'initiation et de maintenance de l'activité de ces cellules isolées *in vitro* n'ont pas été étudiés.

Conclusion

Qu'elles soient intégrées dans un réseau ou isolées, nous avons vu que l'activité spontanée des cellules GABAergiques a des caractéristiques qui les distinguent des neurones glutamatergiques. Leur fréquence de décharge est plus faible, en particulier elles ne déchargent pas à des fréquences plus élevées que 15Hz et montrent de grands silences. Leur activité dans un réseau est peu corrélée avec celles des autres neurones du réseau. Isolées, elles peuvent générer spontanément des décharges avec des caractéristiques très diverses. Mais dans un réseau, elles ne semblent pas initier les bouffées collectives.

Nous avons vu que l'activité des neurones GABAergiques dans les réseaux d'architecture contrôlée se caractérise par un niveau faible activité, des fréquences de décharge maximales basses, l'apparition de longs silences et une activation retard lors d'une bouffée. Les propriétés des neurones inhibiteurs à cet égard sont ainsi très différentes des neurones inhibiteurs en tranches ou *in vivo*. En effet, les neurones GABAergiques dans l'hippocampe ont des fréquences de décharge plus élevées (Whittington et al., 1995; Traub et al., 1996; Fisahn et al., 1998) que dans nos réseaux *in vitro*. En outre, les synapses excitatrices provenant d'une cellule pyramidale apparaissent en tranche très efficaces pour stimuler les interneurons de l'hippocampe (Cohen and Miles, 2000). Ces différences émanent probablement de la spécificité de connectivité des neurones GABAergiques lors de leur développement *in vitro*. La présence d'autapses inhibitrices de grande amplitude peut expliquer en particulier l'absence de hautes fréquences de décharge.

Pour les cellules GABAergiques isolées, j'ai observé fréquemment une activité avec une fréquence caractéristique suggère que ces cellules aient des propriétés intrinsèques qui peuvent déterminer une activité rythmique à une fréquence donnée. On peut rapprocher cette observation de la mise en évidence de fréquences préférentielles propres à certaines cellules GABAergiques dans l'hippocampe dans leur activité spontanée (Parra et al., 1998) ou lors de stimulations sinusoïdales (Pike et al., 2000).

ANNEXE 2

RESEAUX D'ARCHITECTURE CONTROLEE SUR DES RESEAUX D'ELECTRODES

Nous allons montrer que les enregistrements à haute résolution temporelle de tous les neurones simultanément d'un réseau deviennent possible grâce à la réalisation d'interfaces neurones – électronique : des réseaux de neurones d'architecture contrôlée sur des réseaux d'électrodes. Cette année, j'ai encadré le stage de DEA de Carine Douarche avec qui nous avons appliqué la technique de lithographie sur des réseaux d'électrodes.

Nous avons vu qu'une limite majeure de l'estimation de l'activité électrique par imagerie calcique réside dans sa faible résolution temporelle (voir chapitre II). En culture les réseaux d'électrodes (Multi Electrodes Array) permettent de détecter l'activité de plusieurs neurones simultanément avec une résolution temporelle de l'ordre du kHz. Cependant ces électrodes ne peuvent pas détecter le signal provenant de neurones qui ne seraient pas à même l'électrode ou dans un voisinage d'une dizaine de μm . Sans contrôle de la position des neurones, il faut donc cultiver les neurones à très haute densité pour espérer que quelques électrodes enregistrent l'activité de neurones ; dans ce cas, elles enregistrent rarement celle d'un seul neurone (Segev et al., 2001; Segev et al., 2002). D'autre part, les neurones étant très mobiles *in vitro* le suivi de l'activité d'un même réseau au cours du développement n'est pas envisageable. Nous avons pensé que le contrôle de la position des neurones par lithographie pourrait apporter une solution aux problèmes liés à l'heure actuelle à l'utilisation des MEAs.

Depuis quelques années, les techniques de micro-lithographie ont permis la réalisation de réseaux d'électrodes dessinées dans le verre. Le principe de ces techniques est de dessiner à la surface du verre un grand nombre d'électrodes destinées à l'enregistrement extracellulaire de l'activité neuronale ; ces électrodes sont alors reliées par des fils microscopiques gravés dans le verre (et isolés de la solution) à des contacts électriques. En amplifiant la tension mesurée en ces contacts à l'aide d'amplificateurs multi-canaux à bas bruit, il est possible potentiellement de suivre l'activité d'un grand nombre de cellules. Deux principaux types d'électrodes ont été utilisées : soit des électrodes métalliques, de façon analogue aux électrodes extracellulaires utilisées pour les enregistrements *in vitro* et *in vivo*, soit des transistors à effet de champ (Zeck and Fromherz, 2001). Même si les transistors offrent potentiellement un bien meilleur rapport signal sur bruit, leur mise en œuvre est plus délicate et seule des plaques de verre comportant des réseaux de multi-électrodes métalliques sont

disponibles commercialement. Dans ce projet, nous avons ainsi utilisé des systèmes commerciaux fabriqués et distribués par MultiChannels Systems et appelés MEA, Multielectrode Arrays (<http://www.multichannelssystems.com>).

Ces réseaux d'électrodes ont été jusqu'ici utilisés pour l'étude des tranches de cerveau (Egert et al., 2002a) et de cultures de cellules (Segev et al., 2001) *in vitro*. Dans le cas des tranches de cerveau, compte tenu de la distance entre les électrodes et les premières couches actives de cellules, le signal mesuré par chaque électrode ne correspond pas à un enregistrement unitaire mais à un potentiel extra-cellulaire moyenné sur un grand nombre de cellules. La technique permet dans ce cas d'observer, avec une très bonne résolution temporelle (ms) et avec une résolution spatiale peu commune pour une technique électrophysiologique (64 points mesurés simultanément), l'activation dans le temps et l'espace de réseaux de neurones complexes. Dans le cas des cultures, l'intérêt des MEA serait au contraire de donner accès à des enregistrements unitaires. En effet, on peut a priori espérer obtenir la situation où dans une culture de neurones à assez basse densité *un neurone et un seul* se trouve au voisinage immédiat de *chacune* des électrodes. En pratique, les MEA ont été utilisés soit avec des cultures à extrêmement haute densité pour optimiser le nombre d'électrodes enregistrant un signal (mais, outre les problèmes physiologiques posés par ce type de culture très très denses, chaque électrode pourrait enregistrer plusieurs neurones), soit à très basse densité pour avoir une activité unitaire (dans ce cas, peu d'électrodes enregistrent de l'activité). Pour cette raison, de nombreuses équipes cherchent à développer des méthodes de photolithographie pour positionner une et une seule cellule au voisinage immédiat des électrodes (essai de lithographie mais à haute densité : (Segev et al., 2002)).

Nous avons ainsi essayé d'adapter notre protocole de photolithographie pour le rendre compatible avec l'utilisation de MEAs. Nous avons utilisé des MEAs constitués par un réseau carré d'électrodes en TiN de 30 μ m de diamètre séparés par une distance de 200 μ m et reliées chacune via des fils en titane, isolé par une fine couche fragile de SiN, à un contact électrique en or (Fig. 1). Ces plaquettes ont un coût élevé ce qui demande que le protocole de lithographie permette leur recyclage. Elles peuvent ensuite être placées directement dans un boîtier permettant de réaliser de façon aisée les contacts électriques entre la plaquette et un amplificateur de tension multi-canal à bas niveau de bruit (nous ne disposons pas d'un tel ampli). Dans les MEA commercialisées, les caractéristiques électriques de résistance R et de capacité C des électrodes (surface de contact électrodes/solution, diamètre et longueur des fils) ont été optimisées pour optimiser le rapport signal sur bruit de l'expérience (par exemple, grande capacité obtenue par la structure en « cheveux » de la surface en TiN (Fig. 1)) et

ajuster la fréquence de coupure $1/RC$ à 1-10kHz. Ainsi le signal mesuré est directement relié, comme dans une mesure extra-cellulaire classique, à la dérivée du potentiel de membrane.

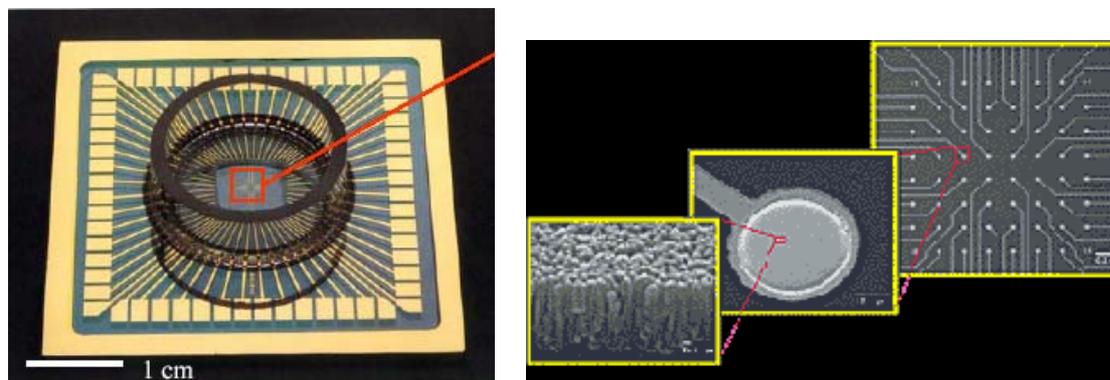


Figure 1 : Réseaux de multiélectrodes fabriqués par MultiChannelsSystems . A gauche, vue complète d'une plaquette de MEA, comportant un anneau de verre colle au sein duquel peut être faite la culture de cellule. Ainsi, l'enregistrement des neurones peut être effectué de manière stérile. A droite, image du réseau d'électrodes avec un détail de la surface ayant une structure en « cheveux » (<http://www.multichannelsystems.com>).

Les principales difficultés rencontrées pour adapter notre protocole ont été les suivantes. D'un point de vue physico-chimique, il a fallu (i) remplacer les acides employés par des solvants préservant les électrodes métalliques, (ii) trouver une graisse à vide compatible avec la culture cellulaire pour fixer après la lithographie une boîte de Pétri sur la MEA et pouvant se nettoyer parfaitement après usage (iii) adapter les temps d'attaque du plasma pour préserver les électrodes (le risque de dégradation provenant surtout de l'échauffement).

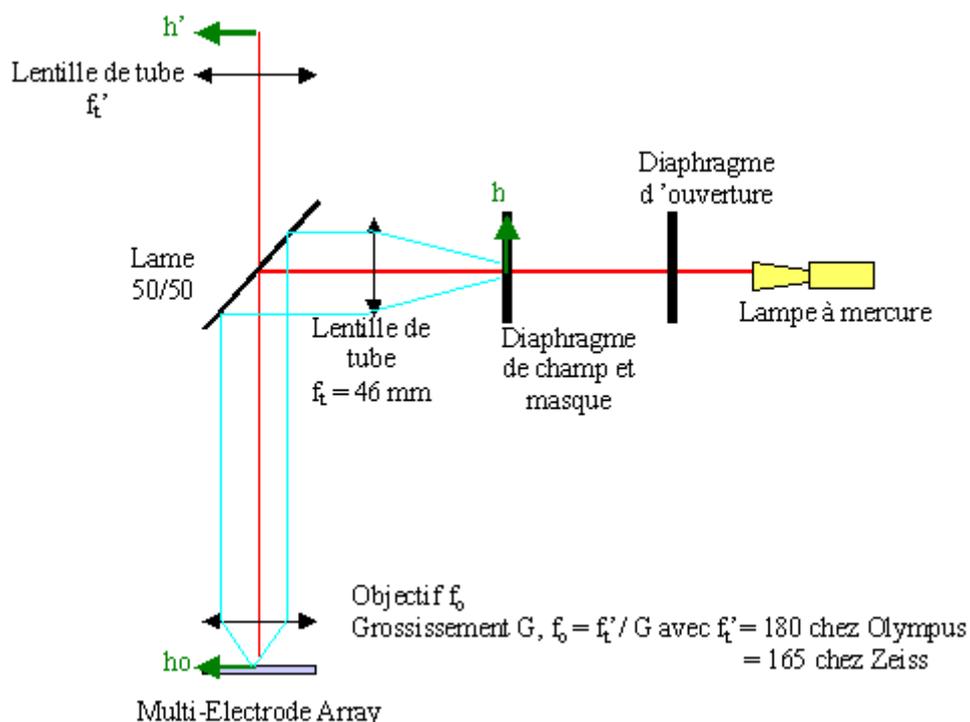


Figure 2. Alignement des masques. Principe du montage optique sur un microscope optique Olympus BX51 permettant d'aligner le masque sur le réseau d'électrode de la MEA et d'insoler la résine photosensible à l'aide de la lampe à mercure du microscope.

D'un point de vue optique, étant donné qu'il n'était plus possible de placer le masque au contact de la MEA car il était nécessaire de l'aligner précisément sur la position des électrodes, nous avons mis au point sur un microscope droit Olympus BX51, un montage (Fig. 2) permettant de projeter l'image du masque (placé à la place du diaphragme de champ de l'éclairage de fluorescence) sur la MEA (placé sur platine porte-échantillon). La lampe mercure de l'éclairage de fluorescence permet, via un jeu de filtres de densité neutre, d'insoler la résine photosensible déposée sur la MEA par spin-coating avec un temps d'exposition raisonnable (1-5s). Nous avons fabriqué nous-mêmes des masques adaptés au grossissement du microscope et à la dimension des MEA. Ainsi, un alignement parfait et rapide à réaliser est obtenu par cette méthode (Fig. 3).

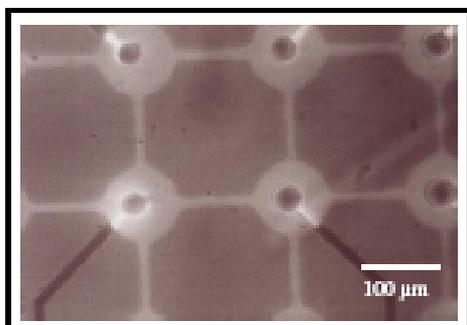


Figure 3. Images superposées du masque projeté (image obtenue en contraste de réflexion) et du réseau d'électrode de la MEA (image obtenue en transmission).

Une fois cette méthode d'alignement obtenue, il a été relativement facile de suivre les étapes du protocole de lithographie décrites dans le chapitre I de cette thèse pour réaliser un motif de contraste d'adhésion polylysine / fluorosilane aligné sur le réseau d'électrodes. Nous avons réalisé des cultures de cellules sur des MEAs sans ou avec lithographie. Dans ce cas, le motif final choisi était constitué de disques de diamètre $60\mu\text{m}$ reliés entre eux par des lignes de $8\mu\text{m}$ de large et de $140\mu\text{m}$ de long. Le diamètre des disques a été choisi aussi petit que possible pour permettre la survie élevée des cellules. Ainsi, pour une électrode de $30\mu\text{m}$ de diamètre au centre du disque, tout corps cellulaire placé sur un disque se trouvera à moins de $10\mu\text{m}$ d'une électrode. Les études déjà réalisées avec des MEAs ont en effet montré, de façon naturelle, que la qualité de la mesure obtenue décroissait très vite avec la distance entre le corps cellulaire et l'électrode. Typiquement, les corps cellulaires doivent être à moins de $10\text{-}20\mu\text{m}$ de l'électrode, la situation la plus favorable étant celle où le neurone touche l'électrode (Claverol-Tinture and Pine, 2002).

Sur les figures 4 et 5, on peut comparer des images obtenus avec et sans lithographie sur des plaquettes de MEA, dans des cultures de neurones de l'hippocampe de rat à basse densité (cf chapitre I, (Banker and Goslin, 1988)). Notre protocole adapté aux MEAs permet une

maintenance de la culture de neurones sur 4 semaines. En outre, on peut voir que la présence d'un pattern d'adhésion : i) augmente considérablement la densité de corps cellulaire placés à moins de $20\mu\text{m}$ d'une électrode ; ii) permet, en fonction de la densité d'avoir un grand nombre d'électrodes avec un neurone à son voisinage. Nous n'avons pas encore quantifié cette augmentation, mais les images sont explicites. A nouveau, il reste toujours un compromis à trouver dans le choix de la densité d'ensemencement. En l'augmentant, on accroît le nombre d'électrodes ayant un neurone à leur voisinage mais on augmente aussi le nombre de cas où plus d'un neurone se trouve au voisinage de la même électrode. On peut envisager dans ce cas, d'utiliser une micropipette pour enlever les quelques neurones en excès aux premières heures de l'ensemencement de la culture (Claverol-Tinture and Pine, 2002).

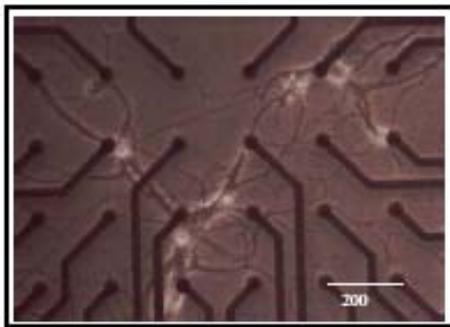


Figure 4 : Culture cellulaire sur une plaquette de MEA n'ayant pas de pattern d'adhésion. Seulement une fraction des électrodes (ici 4 sur 24) est proche (moins de $20\mu\text{m}$) d'un neurone.

Nous n'avons pas encore réalisé d'enregistrements électriques de ces neurones via les MEAs, car nous n'avons pas les amplificateurs de tension adaptés. Néanmoins, nous avons vérifié que le traitement de photolithographie ne modifie pas les propriétés électriques des électrodes, i.e. leur impédance complexe. Nous avons non seulement caractérisé l'évolution de l'impédance à 1kHz (valeur « utile » pour la mesure), mais essayer de la caractériser entièrement entre environ 1Hz et 100kHz . Ceci a permis d'abord de montrer que l'électrode se comportait bien comme un circuit R, C en série, avec une fréquence de coupure de l'ordre du kHz . Au cours du protocole de photolithographie, l'impédance complexe augmente fortement lors de la silanisation (Fig. 6). Néanmoins, le traitement plasma (qui précède l'étape de dépôt de polylysine commune à tous les protocoles, avec ou sans lithographie) permet de restaurer une impédance quasiment identique à celle de la MEA propre (Fig. 6).

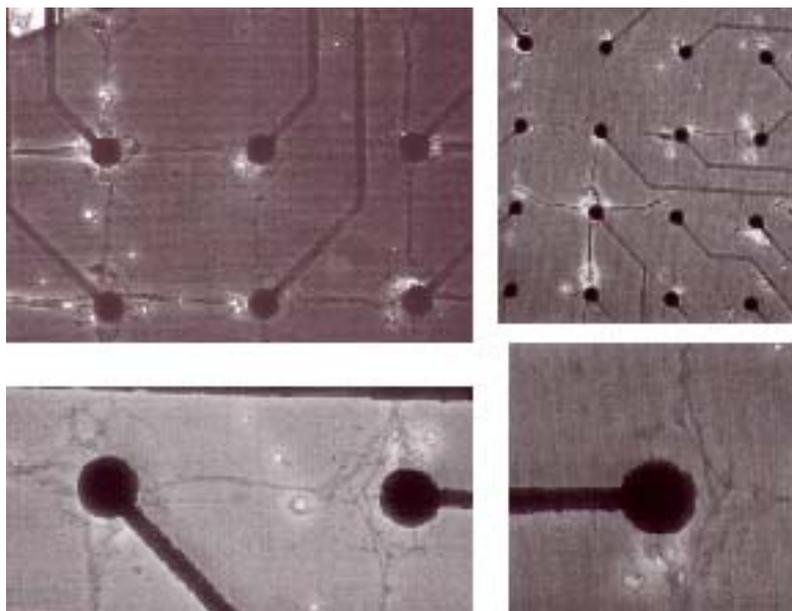


Figure 5. Images de culture de neurones de l'hippocampe de rat embryons sur des plaquettes de MEA ayant un pattern d'adhésion. Les corps cellulaires sont bien placés au voisinage des électrodes et les neurites sont guidées par les chemins de polylysine les reliant. Dans ces cultures réalisées à des densités similaires à celles utilisés sur la figure 4, on observe que la majorité des électrodes (par exemple 12/16 sur la figure 5 en haut à gauche) ont un (ou parfois deux) neurones à proximité immédiate.

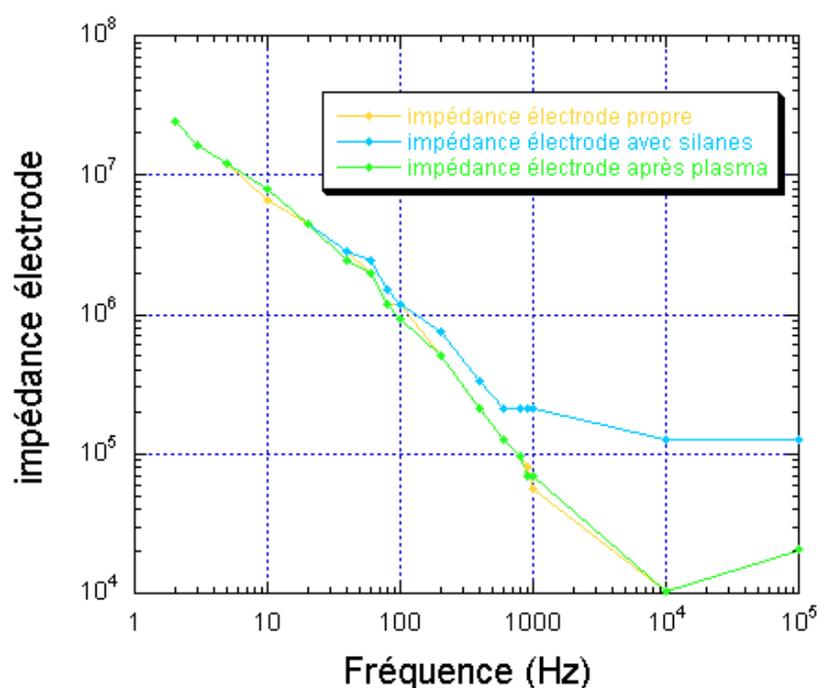


Figure 6. Impédance complexe d'une même électrode de MEA au cours du protocole de photolithographie. En jaune : électrode propre ; en bleu : après silanisation ; en vert : après plasma.

Notre protocole de lithographie peut donc être facilement adapté à des plaquettes contenant des réseaux de multi-électrodes gravées dans le verre. Les premiers résultats montrent qualitativement une forte augmentation du nombre d'électrodes ayant un neurone à leur voisinage immédiat. Les caractéristiques électriques de l'électrode n'étant pas modifiées, notre étude suggère que la réalisation d'études avec les MEA est possible dans conditions de densité en cellules raisonnables tout en enregistrant un grand nombre de cellules. Cette approche permet d'envisager l'enregistrement des mêmes neurones d'un réseau à long terme. La résolution temporelle des MEA associés au grand nombre d'électrodes rend possible des mesures au cours du temps et la stimulation sélective de neurones (Jimbo et al., 2003).

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abeles M (1991) *Corticonics, Neural circuits of the cerebral cortex* Cambridge University Press.
- Alger BE, Nicoll RA (1982) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol* 328:105-123.
- Ali AB, Bannister AP, Thomson AM (1999) IPSPs elicited in CA1 pyramidal cells by putative basket cells in slices of adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 11:1741-1753.
- Alonso MT, Chamero P, Villalobos C, Garcia-Sancho J (2003) Fura-2 antagonises calcium-induced calcium release. *Cell Calcium* 33:27-35.
- Akita T, Kuba K (2000) Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca(2+) channels, and Ca(2+)-activated K(+) channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol* 116:697-720.
- Albowitz B, Konig P, Kuhnt U (1997) Spatiotemporal distribution of intracellular calcium transients during epileptiform activity in guinea pig hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77:491-501.
- Alger BE, Nicoll RA (1982) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol* 328:105-123.
- Ali AB, Bannister AP, Thomson AM (1999) IPSPs elicited in CA1 pyramidal cells by putative basket cells in slices of adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 11:1741-1753.
- Alonso MT, Chamero P, Villalobos C, Garcia-Sancho J (2003) Fura-2 antagonises calcium-induced calcium release. *Cell Calcium* 33:27-35.
- Amit DJ, Brunel N, Tsodyks MV (1994) Correlations of cortical Hebbian reverberations: theory versus experiment. *J Neurosci* 14:6435-6445.
- Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A (1996) Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* 273:1868-1871.
- Albowitz B, Konig P, Kuhnt U (1997) Spatiotemporal distribution of intracellular calcium transients during epileptiform activity in guinea pig hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77:491-501.
- Atluri PP, Regehr WG (1998) Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:8214-8227.

B

- Bacci A, Verderio C, Pravettoni E, Matteoli M (1999) Synaptic and intrinsic mechanisms shape synchronous oscillations in hippocampal neurons in culture. *Eur J Neurosci* 11:389-397.
- Banker G, Goslin K (1988) *Developments in neuronal cell culture*. Nature 336:185-186.
- Baranes D, Lopez-Garcia JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1996) Reconstitution of the hippocampal mossy fiber and associational-commissural pathways in a novel dissociated cell culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4706-4711.
- Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4:1944-1953.

- Bekkers JM, Stevens CF (1991) Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7834-7838.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19:7617-7628.
- Bi G, Poo M (1999) Distributed synaptic modification in neural networks induced by patterned stimulation. *Nature* 401:792-796.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464-10472.
- Blackwell KT, Czubyko U, Plenz D (2003) Quantitative estimate of synaptic inputs to striatal neurons during up and down states in vitro. *J Neurosci* 23:9123-9132.
- Brunel N, Chance FS, Fourcaud N, Abbott LF (2001) Effects of synaptic noise and filtering on the frequency response of spiking neurons. *Phys Rev Lett* 86:2186-2189.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.

C

- Carter AG, Regehr WG (2002) Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat Neurosci* 5:1309-1318.
- Catsicas M, Bonness V, Becker D, Mobbs P (1998) Spontaneous Ca²⁺ transients and their transmission in the developing chick retina. *Curr Biol* 8:283-286.
- Chin H (1998) Molecular biology of neuronal voltage-gated calcium channels. *Exp Mol Med* 30:123-130.
- Chub N, O'Donovan MJ (1998) Blockade and recovery of spontaneous rhythmic activity after application of neurotransmitter antagonists to spinal networks of the chick embryo. *J Neurosci* 18:294-306.
- Claverol-Tinture E, Pine J (2002) Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *J Neurosci Methods* 117:13-21.
- Cobb SR, Halasy K, Vida I, Nyiri G, Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* 79:629-648.
- Cohen I, Miles R (2000) Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus. *J Physiol* 524 Pt 2:485-502.
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crepel V (1997) A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17:5366-5379.
- Cossart R, Aronov D, Yuste R (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423:283-288.
- Craig AM, Blackstone CD, Hugarir RL, Banker G (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10:1055-1068.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:3166-3177.

Cummings DD, Wilcox KS, Dichter MA (1996) Calcium-dependent paired-pulse facilitation of miniature EPSC frequency accompanies depression of EPSCs at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci* 16:5312-5323.

D

Dichter M, Spencer WA (1969) Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. *J Neurophysiol* 32:663-687.

DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245-256.

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.

E

Egert U, Heck D, Aertsen A (2002a) Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices. *Exp Brain Res* 142:268-274.

Egert U, Knott T, Schwarz C, Nawrot M, Brandt A, Rotter S, Diesmann M (2002b) MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MATLAB. *J Neurosci Methods* 117:33-42.

Evans MS, Collings MA, Brewer GJ (1998) Electrophysiology of embryonic, adult and aged rat hippocampal neurons in serum-free culture. *J Neurosci Methods* 79:37-46.

F

Fedirchuk B, Wenner P, Whelan PJ, Ho S, Tabak J, O'Donovan MJ (1999) Spontaneous network activity transiently depresses synaptic transmission in the embryonic chick spinal cord. *J Neurosci* 19:2102-2112.

Feller MB (1999) Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22:653-656.

Feller MB (2002) The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development. *J Neurobiol* 53:556-567.

Feller MB, Delaney KR, Tank DW (1996a) Presynaptic calcium dynamics at the frog retinotectal synapse. *J Neurophysiol* 76:381-400.

Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ (1996b) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* 272:1182-1187.

Feller MB, Butts DA, Aaron HL, Rokhsar DS, Shatz CJ (1997) Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves. *Neuron* 19:293-306.

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

Fitzsimonds RM, Song HJ, Poo MM (1997) Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks. *Nature* 388:439-448.

Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

G

- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507 (Pt 1):219-236.
- Goda Y, Stevens CF (1996) Long-term depression properties in a simple system. *Neuron* 16:103-111.
- Goodman CS, Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 Suppl:77-98.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507-1516.
- Grantyn R, Kraszewski K, Melnick I, Taschenberger H, Warton SS (1995) In vitro development of vertebrate central synapses. *Perspect Dev Neurobiol* 2:387-397.
- Grosse G, Tapp R, Wartenberg M, Sauer H, Fox PA, Grosse J, Gratzl M, Bergmann M (1998) Prenatal hippocampal granule cells in primary cell culture form mossy fiber boutons at pyramidal cell dendrites. *J Neurosci Res* 51:602-611.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Gulyas AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF (1993) Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366:683-687.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.

H

- Hagler DJ, Jr., Goda Y (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85:2324-2334.
- Hammerle H, Egert U, Mohr A, Nisch W (1994) Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron* 9:691-696.
- Harris KD, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, Czurko A, Buzsaki G (2002a) Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 417:738-741.
- Harris RE, Coulombe MG, Feller MB (2002b) Dissociated retinal neurons form periodically active synaptic circuits. *J Neurophysiol* 88:188-195.
- Helmchen F, Borst JG, Sakmann B (1997) Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophys J* 72:1458-1471.
- Hirsch JC, Fourment A, Marc ME (1983) Sleep-related variations of membrane potential in the lateral geniculate body relay neurons of the cat. *Brain Res* 259:308-312.
- Hotson JR, Prince DA (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 43:409-419.
- Huguenard JR, McCormick DA (1992) Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* 68:1373-1383.

I

- Ikegaya Y, Itsukaichi-Nishida Y, Ishihara M, Tanaka D, Matsuki N (2000) Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 microm. *Neuroscience* 97:215-217.

J

- Jimbo Y, Tateno T, Robinson HP (1999) Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J* 76:670-678.
- Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, Tateno T, Robinson HP (2003) A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng* 50:241-248.
- Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2:241-245.

K

- Karabelas AB, Purpura DP (1980) Evidence for autapses in the substantia nigra. *Brain Res* 200:467-473.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Kenet T, Bibitchkov D, Tsodyks M, Grinvald A, Arieli A (2003) Spontaneously emerging cortical representations of visual attributes. *Nature* 425:954-956.
- Khazipov R, Leinekugel X, Khalilov I, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1997) Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J Physiol* 498 (Pt 3):763-772.
- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben-Ari Y (2001) Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci* 21:9770-9781.
- Kleinfeld D, Kahler KH, Hockberger PE (1988) Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *J Neurosci* 8:4098-4120.
- Knowles WD, Schwartzkroin PA (1981) Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci* 1:318-322.

L

- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1987) Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7:1979-1993.
- Lancaster B, Hu H, Ramakers GM, Storm JF (2001) Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 536:809-823.
- Le Masson G, Renaud-Le Masson S, Debay D, Bal T (2002) Feedback inhibition controls spike transfer in hybrid thalamic circuits. *Nature* 417:854-858.
- Lee SH, Rosenmund C, Schwaller B, Neher E (2000) Differences in Ca²⁺ buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat. *J Physiol* 525 Pt 2:405-418.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.
- Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsaki G (2002) Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science* 296:2049-2052.
- Lo YJ, Poo MM (1994) Heterosynaptic suppression of developing neuromuscular synapses in culture. *J Neurosci* 14:4684-4693.
- Lubke J, Markram H, Frotscher M, Sakmann B (1996) Frequency and dendritic distribution of autapses established by layer 5 pyramidal neurons in the developing rat neocortex:

comparison with synaptic innervation of adjacent neurons of the same class. *J Neurosci* 16:3209-3218.

M

- Ma W, Liu QY, Jung D, Manos P, Pancrazio JJ, Schaffner AE, Barker JL, Stenger DA (1998) Central neuronal synapse formation on micropatterned surfaces. *Brain Res Dev Brain Res* 111:231-243.
- Maeda E, Robinson HP, Kawana A (1995) The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *J Neurosci* 15:6834-6845.
- Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, Froemke RC, Yuste R (2001) Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32:883-898.
- Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78:2655-2667.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Roth A, Sakmann B (1997) Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J Physiol* 500 (Pt 2):409-440.
- Matsuzawa M, Tabata T, Knoll W, Kano M (2000) Formation of hippocampal synapses on patterned substrates of a laminin-derived synthetic peptide. *Eur J Neurosci* 12:903-910.
- McCarley RW, Benoit O, Barrionuevo G (1983) Lateral geniculate nucleus unitary discharge in sleep and waking: state- and rate-specific aspects. *J Neurophysiol* 50:798-818.
- McCormick DA, Bal T (1994) Sensory gating mechanisms of the thalamus. *Curr Opin Neurobiol* 4:550-556.
- McCormick DA, Bal T (1997) Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185-215.
- McCormick DA, Contreras D (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 63:815-846.
- McKinney RA, Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM (1997) Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nat Med* 3:990-996.
- Menendez de la Prida L, Sanchez-Andres JV (2000) Heterogeneous populations of cells mediate spontaneous synchronous bursting in the developing hippocampus through a frequency-dependent mechanism. *Neuroscience* 97:227-241.
- Menendez de la Prida L, Bolea S, Sanchez-Andres JV (1998) Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:899-906.
- Miles R (1990) Variation in strength of inhibitory synapses in the CA3 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol* 431:659-676.
- Miles R, Wong RK (1983) Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306:371-373.
- Miles R, Wong RK (1986) Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 373:397-418.
- Miles R, Wong RK, Traub RD (1984) Synchronized afterdischarges in the hippocampus: contribution of local synaptic interactions. *Neuroscience* 12:1179-1189.
- Milner LD, Landmesser LT (1999) Cholinergic and GABAergic inputs drive patterned spontaneous motoneuron activity before target contact. *J Neurosci* 19:3007-3022.
- Morgenthaler FD, Knott GW, Floyd Sarria JC, Wang X, Staple JK, Catsicas S, Hirling H (2003) Morphological and molecular heterogeneity in release sites of single neurons. *Eur J Neurosci* 17:1365-1374.

Muramoto K, Ichikawa M, Kawahara M, Kobayashi K, Kuroda Y (1993) Frequency of synchronous oscillations of neuronal activity increases during development and is correlated to the number of synapses in cultured cortical neuron networks. *Neurosci Lett* 163:163-165.

N

Nagler K, Mauch DH, Pfrieger FW (2001) Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* 533:665-679.

O

O'Donovan MJ, Chub N, Wenner P (1998) Mechanisms of spontaneous activity in developing spinal networks. *J Neurobiol* 37:131-145.

Offenhausser A, Sprossler C, Matsuzawa M, Knoll W (1997a) Field-effect transistor array for monitoring electrical activity from mammalian neurons in culture. *Biosens Bioelectron* 12:819-826.

Offenhausser A, Sprossler C, Matsuzawa M, Knoll W (1997b) Electrophysiological development of embryonic hippocampal neurons from the rat grown on synthetic thin films. *Neurosci Lett* 223:9-12.

Opitz T, De Lima AD, Voigt T (2002) Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol* 88:2196-2206.

P

Papa M, Bundman MC, Greenberger V, Segal M (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* 15:1-11.

Pare D, Lebel E, Lang EJ (1997) Differential impact of miniature synaptic potentials on the soma and dendrites of pyramidal neurons in vivo. *J Neurophysiol* 78:1735-1739.

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

Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science* 279:2108-2112.

Peterlin ZA, Kozloski J, Mao BQ, Tsiola A, Yuste R (2000) Optical probing of neuronal circuits with calcium indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3619-3624.

Peters A, Proskauer CC (1980) Synaptic relationships between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in the rat visual cortex. A combined Golgi-electron microscope study. *J Neurocytol* 9:163-183.

Pettit DL, Augustine GJ (2000) Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* 84:28-38.

Pickard L, Noel J, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E (2000) Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7922-7931.

Pike FG, Goddard RS, Suckling JM, Ganter P, Kasthuri N, Paulsen O (2000) Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *J Physiol* 529 Pt 1:205-213.

- Pouzat C, Marty A (1998) Autaptic inhibitory currents recorded from interneurons in rat cerebellar slices. *J Physiol* 509 (Pt 3):777-783.
- Preston RJ, Bishop GA, Kitai ST (1980) Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. *Brain Res* 183:253-263.
- Provine RR (1972) Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Res* 41:365-378.

R

- Ranck JB, Jr. (1973) Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* 41:461-531.
- Rao A, Cha EM, Craig AM (2000) Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:8344-8353.
- Regehr WG, Atluri PP (1995) Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals. *Biophys J* 68:2156-2170.
- Robinson HP, Kawahara M, Jimbo Y, Torimitsu K, Kuroda Y, Kawana A (1993) Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. *J Neurophysiol* 70:1606-1616.

S

- Sabatini BL, Regehr WG (1995) Detecting changes in calcium influx which contribute to synaptic modulation in mammalian brain slice. *Neuropharmacology* 34:1453-1467.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3:1027-1034.
- Schiller PH, Finlay BL, Volman SF (1976) Short-term response variability of monkey striate neurons. *Brain Res* 105:347-349.
- Scholl M, Sprossler C, Denyer M, Krause M, Nakajima K, Maelicke A, Knoll W, Offenhausser A (2000) Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *J Neurosci Methods* 104:65-75.
- Scobey RP, Gabor AJ (1989) Orientation discrimination sensitivity of single units in cat primary visual cortex. *Exp Brain Res* 77:398-406.
- Segal MM (1991) Epileptiform activity in microcultures containing one excitatory hippocampal neuron. *J Neurophysiol* 65:761-770.
- Segal MM, Furshpan EJ (1990) Epileptiform activity in microcultures containing small numbers of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 64:1390-1399.
- Segev R, Shapira Y, Benveniste M, Ben-Jacob E (2001) Observations and modeling of synchronized bursting in two-dimensional neural networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 64:011920.
- Segev R, Benveniste M, Hulata E, Cohen N, Palevski A, Kapon E, Shapira Y, Ben-Jacob E (2002) Long term behavior of lithographically prepared in vitro neuronal networks. *Phys Rev Lett* 88:118102.
- Shatz CJ (1992) The developing brain. *Sci Am* 267:60-67.
- Shatz CJ (1997) Form from function in visual system development. *Harvey Lect* 93:17-34.
- Shi WX, Rayport S (1994) GABA synapses formed in vitro by local axon collaterals of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* 14:4548-4560.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423:288-293.

- Siebler M, Koller H, Stichel CC, Muller HW, Freund HJ (1993) Spontaneous activity and recurrent inhibition in cultured hippocampal networks. *Synapse* 14:206-213.
- Smetters D, Majewska A, Yuste R (1999) Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18:215-221.
- Softky WR, Koch C (1993) The highly irregular firing of cortical cells is inconsistent with temporal integration of random EPSPs. *J Neurosci* 13:334-350.
- Staley KJ, Otis TS, Mody I (1992) Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol* 67:1346-1358.
- Staley KJ, Longacher M, Bains JS, Yee A (1998) Presynaptic modulation of CA3 network activity. *Nat Neurosci* 1:201-209.
- Stenger DA, Hickman JJ, Bateman KE, Ravenscroft MS, Ma W, Pancrazio JJ, Shaffer K, Schaffner AE, Cribbs DH, Cotman CW (1998) Microlithographic determination of axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 82:167-173.
- Steriade M, Contreras D, Curro Dossi R, Nunez A (1993) The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J Neurosci* 13:3284-3299.
- Steriade M, Contreras D, Curro Dossi R, Nunez A (1993) The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J Neurosci* 13:3284-3299.

T

- Tabak J, Rinzel J, O'Donovan MJ (2001) The role of activity-dependent network depression in the expression and self-regulation of spontaneous activity in the developing spinal cord. *J Neurosci* 21:8966-8978.
- Tabak J, Senn W, O'Donovan MJ, Rinzel J (2000) Modeling of spontaneous activity in developing spinal cord using activity-dependent depression in an excitatory network. *J Neurosci* 20:3041-3056.
- Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Massive autaptic self-innervation of GABAergic neurons in cat visual cortex. *J Neurosci* 17:6352-6364.
- Tank DW, Regehr WG, Delaney KR (1995) A quantitative analysis of presynaptic calcium dynamics that contribute to short-term enhancement. *J Neurosci* 15:7940-7952.
- Tao H, Zhang LI, Bi G, Poo M (2000) Selective presynaptic propagation of long-term potentiation in defined neural networks. *J Neurosci* 20:3233-3243.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J (1996) Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol* 496 (Pt 1):81-102.
- Traub RD, Whittington MA, Colling SB, Buzsaki G, Jefferys JG (1996) Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol* 493 (Pt 2):471-484.
- Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A, Arieli A (1999) Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science* 286:1943-1946.
- Turrigiano G, Abbott LF, Marder E (1994) Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science* 264:974-977.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896.

V

- van den Pol AN, Obrietan K, Belousov AB, Yang Y, Heller HC (1998) Early synaptogenesis in vitro: role of axon target distance. *J Comp Neurol* 399:541-560.
- Van der Loos H, Glaser EM (1972) Autapses in neocortex cerebri: synapses between a pyramidal cell's axon and its own dendrites. *Brain Res* 48:355-360.
- Verderio C, Coco S, Pravettoni E, Bacci A, Matteoli M (1999) Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cell Mol Life Sci* 55:1448-1462.
- Vogels R, Spileers W, Orban GA (1989) The response variability of striate cortical neurons in the behaving monkey. *Exp Brain Res* 77:432-436.
- Voigt T, Opitz T, de Lima AD (2001) Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons. *J Neurosci* 21:8895-8905.

W

- Wang X, Gruenstein EI (1997) Mechanism of synchronized Ca²⁺ oscillations in cortical neurons. *Brain Res* 767:239-249.
- Wang XJ (2001) Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci* 24:455-463.
- Weiss JL, Burgoyne RD (2002) Sense and sensibility in the regulation of voltage-gated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci* 25:489-491.
- Weliky M, Katz LC (1999) Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo. *Science* 285:599-604.
- Wheeler BC, Corey JM, Brewer GJ, Branch DW (1999) Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture. *J Biomech Eng* 121:73-78.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG (1995) Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373:612-615.
- Wiesel TN, Hubel DH (1974) Ordered arrangement of orientation columns in monkeys lacking visual experience. *J Comp Neurol* 158:307-318.
- Wilcox KS, Buchhalter J, Dichter MA (1994) Properties of inhibitory and excitatory synapses between hippocampal neurons in very low density cultures. *Synapse* 18:128-151.
- Wong RK, Traub RD, Miles R (1986) Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv Neurol* 44:583-592.
- Wong RO (1999) Retinal waves and visual system development. *Annu Rev Neurosci* 22:29-47.
- Wong RO, Meister M, Shatz CJ (1993) Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* 11:923-938.
- Wong WT, Sanes JR, Wong RO (1998) Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina. *J Neurosci* 18:8839-8852.

X

- Xiang Y, Li Y, Zhang Z, Cui K, Wang S, Yuan XB, Wu CP, Poo MM, Duan S (2002) Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci* 5:843-848.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2000) Maximinins. *Nat Neurosci* 3:1229-1230.

Y

Yuste R, Nelson DA, Rubin WW, Katz LC (1995) Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14:7-17.

Z

Zeck G, Fromherz P (2001) Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10457-10462.

Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1207-1214.