



HAL
open science

Etude en microscopie de fluorescence à deux photons in vivo de l'intégration multi vibrissale chez le rat

Julien Bertherat

► **To cite this version:**

Julien Bertherat. Etude en microscopie de fluorescence à deux photons in vivo de l'intégration multi vibrissale chez le rat. Neurosciences. Ecole Normale Supérieure de Paris - ENS Paris, 2012. Français. NNT: . tel-00789937

HAL Id: tel-00789937

<https://theses.hal.science/tel-00789937>

Submitted on 19 Feb 2013

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

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



Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure

Présentée par
Julien Bertherat

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Normale Supérieure
Spécialité : Neurosciences

Etude en microscopie de fluorescence à deux photons *in vivo* de l'intégration multi vibrissale chez le rat

Soutenue le 17 décembre 2012

Jury

Dr Daniel PRESSNITZER
Dr Frédéric PAIN
Dr Sylvain CROCHET
Dr Daniel SHULZ
Dr Laurent BOURDIEU

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Sommaire

Sommaire	5
Résumé.....	9
I. Introduction	13
I.1. Le système tactile des vibrisses chez le rat	13
I.1.1 Le rat	13
I.1.2 Les vibrisses : un organe sensori-moteur	13
Description anatomique	13
Utilisation comportementale	14
De la vibrisse au cortex : chemin anatomique afférent	17
I.1.3 Le cortex somato sensoriel.....	20
Le cortex à tonneaux	21
Somatotopie	23
Composition cellulaire	24
Connectivité intra corticale	24
I.2. Champs récepteurs	25
I.2.1 Les champs récepteurs sous-corticaux	26
I.2.2 Champs récepteurs corticaux infra- et supra- laminaires	26
I.2.3 Sélectivité directionnelle	28
I.2.4 Organisation spatiale des neurones	29
I.2.5 Intégration multi vibrissale	33
Intégration temporelle	33
Intégration multi vibrissale d'ordre élevé	33
I.2.6 Cellules simples et cellules complexes	36
Problématique sur l'intégration multi vibrissale	40
I.3. Microscopie à deux photons.....	41
I.3.1 Principe	42
I.3.2 Imagerie en profondeur	43
I.3.3 Résolutions axiales et latérales.....	44

I.3.4	Propriétés des sondes calciques	46
I.3.5	Signaux acquis - Transitoires calciques	48
	Problématique sur la microscopie à deux photons <i>in vivo</i>	52
	Problématique générale	53
II.	Enregistrement de l'activité neuronale en microscopie à deux photons.....	55
II.1.	Introduction	55
II.2.	Matériels et méthodes	58
II.2.1	Montage	58
II.2.2	Caractérisation de la collection des photons par la détection à 2 PMT	61
II.2.3	Résolution spatiale	63
II.2.4	Acquisition rapide d'images et visualisation en temps réel.....	65
II.2.5	Analyse des images.....	67
	Linéarisation.....	67
	Détermination des ROI	68
	Correction des artefacts dus au mouvement.....	70
II.2.6	Chirurgie	71
	Procédures chirurgicales	71
	Injection de sondes calciques à volume constant.....	72
	Système de contention limitant les bruits mécaniques.....	73
II.2.7	Modélisation du bruit de photons :	74
	Effet de la « Pair Pulse Resolution ».....	74
II.3.	Résultats.....	77
II.3.1	Modélisation du rapport signal sur bruit.....	77
II.3.2	Comparaison avec les expériences	80
	Fluorescéine	80
	Billes fluorescentes	81
	Quantification précise du bruit dans les expériences <i>in vivo</i>	82
II.3.3	Photo blanchiment	86
II.3.4	Transitoires calciques	87
II.4.	Discussion.....	91
II.4.1	Le microscope.....	91
II.4.2	Signaux enregistrés.....	92
III.	Intégration multi vibrissale	95

III.1.	Introduction	95
III.1.1	Espace des phases 2D des stimulations préférentielles (filtres linéaires)	95
III.1.2	Sélectivité à la phase : codage de vitesse et/ou de position.....	97
III.1.3	Différentiation entre sélectivité à la phase et sélectivité à la direction ...	99
III.1.4	Effet de la corrélation multi vibrissale : caractère local ou global des neurones	101
III.1.5	Répartition et organisation spatiale des différents types de neurones...	103
III.2.	Méthode	104
III.2.1	Chirurgie.....	104
III.2.2	Microscopie	104
III.2.3	Analyse des signaux calciques	104
III.2.4	Stimulations.....	106
	Matrice de stimulation.....	106
	Protocole de stimulation.....	108
III.2.5	Histologie	110
III.3.	Résultats.....	112
III.3.1	Champs récepteurs	112
III.3.2	Cellules globales et cellules locales	113
	Définition des populations globales et locales.....	113
	Localisation des cellules globales et locales	115
III.3.3	Sélectivités à la phase et à la direction	118
	Interdépendance des paramètres de stimulation.....	118
	i. Influence de la phase sur la sélectivité à la direction	118
	ii. Influence de la direction sur la sélectivité à la phase	119
	iii. Corrélations croisées entre sélectivité à la phase et la sélectivité à la direction	119
	Cartographie des préférences directionnelles.....	121
	i. Préférence directionnelle à l'échelle d'un champ de neurones	121
	ii. Préférence directionnelle à l'échelle du tonneau.....	122
	iii. Stimulations corrélées	124
III.4.	Discussion.....	125
III.4.1	Correspondance entre champs récepteurs et reconstruction histologique.	125

III.4.2	Cellules globales et locales.....	127
III.4.3	Sélectivités à la phase et à la direction.....	128
III.4.4	Analyses possibles.....	131
	Conclusion	133
	Bibliographie.....	135

Résumé

Ce sujet de thèse est à l'interface entre les neurosciences et l'optique et porte sur la représentation de l'information sensorielle tactile collectée par l'ensemble des vibrisses du rat par microscopie optique à deux photons.

Le rat possède un ensemble de longues vibrisses situées au niveau de son museau qu'il peut bouger activement sur l'axe caudo-rostral à une fréquence moyenne de 5 à 10Hz (ce mouvement est appelé *whisking*, Figure I.2), ce qui lui permet d'explorer l'espace, de localiser les objets et de discriminer des textures (Figure I.1). L'information sensorielle provenant des récepteurs périphériques des follicules où s'insèrent vibrisses atteint, via des relais mésencéphaliques et thalamiques, des modules discrets, appelés « tonneaux », de la couche IV du cortex somato-sensoriel primaire. De nombreuses études anatomiques et électrophysiologiques ont démontré la correspondance entre une vibrisse et un tonneau du cortex : dans chaque tonneau, les neurones répondent de façon maximale et avec une latence minimale, en émettant des potentiels d'action à la déflexion de la vibrisse correspondante, dite principale (Simons and Woolsey 1979; Chapin and Lin 1984; Land and Simons 1985). En outre, les neurones d'un tonneau répondent d'autant plus que la vitesse de déflexion de la vibrisse est élevée et cette réponse varie avec l'angle de déflexion (Simons 1985). Cette architecture apparemment simple en modules corticaux fonctionnellement et anatomiquement bien définis et la possibilité de stimuler facilement les vibrisses font de ce système un modèle majeur pour l'analyse des mécanismes neurophysiologiques impliqués dans l'intégration sensorielle.

Parmi les études récentes du système des vibrisses, nous allons souligner ici trois développements importants en lien avec le sujet de cette thèse. Premièrement l'équipe de Moore au MIT a montré que les neurones d'un tonneau s'organisent spatialement en fonction de leur préférence pour la direction de déflexion de la vibrisse principale : des neurones ayant une direction préférentielle similaire sont regroupés en domaines formant des « micro-colonnes » au sein d'une colonne corticale. En outre, la position des micro-colonnes est corrélée à l'organisation anatomique (Andermann and Moore 2006). Deuxièmement, d'autres études ont montré que la déflexion d'une vibrisse voisine à la vibrisse principale, même distante, induit des réponses supra ou infra laminaires (Moore and Nelson 1998; Zhu and Connors 1999), via des connexions horizontales entre colonnes corticales, susceptibles de moduler fortement la réponse à la déflexion de la vibrisse principale lorsque d'autres vibrisses sont stimulées (Shimegi, Ichikawa et al. 1999; Ego-Stengel, Mello e Souza et al. 2005). Finalement, une étude récente a démontré que l'ensemble des stimulations induisant une réponse corticale pouvait être décomposé suivant une base de deux stimulations propres que nous appellerons « phases » (Estebanez, Boustani et al. 2012). Par ailleurs, cette même étude a montré l'existence de deux populations distinctes de neurones répondant de manière différente selon le niveau de corrélation entre les stimulations des différentes vibrisses. Ces données suggèrent que les vibrisses du rat ne doivent pas être considérées comme un ensemble de capteurs tactiles indépendants mais comme un organe sensoriel composé de plusieurs capteurs en interaction.

Dans mon travail de thèse, j'ai étudié les réponses neuronales en couches II/III dans deux conditions de stimulation : 1) induites par de la déflexion d'une seule vibrisse en fonction des deux paramètres que sont la « phase » et la direction de stimulation. Plus précisément, nous nous intéressons aux cartes fonctionnelles représentant au sein d'un tonneau la sélectivité des neurones pour la direction de déflexion de la vibrisse principale et pour la « phase » de cette stimulation. 2) D'un point de vue multi-vibrissal, nous nous intéressons à l'organisation spatiale des neurones en couches II/III en fonction du niveau de corrélation entre les stimulations de la vibrisse principale et celles des vibrisses adjacentes. Nous étudions en particulier si certains neurones du cortex à tonneaux du rat sont spécialisés dans la détection de contrastes de phase ou de contrastes de déflexion angulaire, comme ceux rencontrés lorsque la vibrisse principale est défléchie dans une direction tandis qu'une ou plusieurs vibrisses adjacentes sont défléchies dans des directions opposées. La possibilité de détecter de tels contrastes est par exemple une propriété remarquable du système visuel.

Pour aborder ces questions, nous devons appliquer des stimulations contrôlées et de manière simultanée sur un nombre important de vibrisses. A cette fin, nous utilisons un système de stimulation multi-vibrisse original, développé par l'équipe de Daniel Shulz, permettant de défléchir de façon contrôlée jusqu'à 24 vibrisses. Une étape importante de mon travail de thèse a été l'installation d'une telle matrice de stimulation sur le montage de microscopie à deux photons utilisé dans mes expériences. A l'aide de ce système, nous voulons étudier (1) comment la réponse à la « phase » de la déflexion de la vibrisse principale est modulée par la direction de déflexion ; (2) comment la réponse à la direction de la déflexion de la vibrisse principale est modulée par la « phase » de déflexion et (3) comment sont organisées spatialement les cellules en fonction de leur réponse à des niveaux différents de corrélation entre les stimulations de la vibrisse principale et celles des vibrisses adjacentes

Nous abordons ces questions au moyen de la microscopie à deux photons. Cette technique permet d'imager l'activité du réseau avec une résolution cellulaire dans le cortex *in vivo* jusqu'à des profondeurs de 300 à 500 μ m. Pour chaque type de stimulation, nous détecterons les potentiels d'action émis par les neurones en repérant les entrées d'ions calcium dans les neurones consécutives aux potentiels d'action (Smetters, Majewska et al. 1999). Pour cela, nous injectons sous pression des sondes fluorescentes calciques (Oregon-Green Bapta-1-AM), ce qui permet de marquer des milliers de cellules dans une sphère d'environ 500 μ m de diamètre (Kerr, Greenberg et al. 2005; Ohki, Chung et al. 2005). Au cours de ma thèse, la mise au point de marquage de ce type de façon reproductible et sur une grande échelle spatiale (1mm²) a été nécessaire.

Nous disposions au laboratoire au début de ma thèse d'un montage permettant d'obtenir des images plein champ à une cadence de 10 à 80 Hz. Pour effectuer les expériences envisagées, un certain nombre de développements et améliorations techniques se sont avérés nécessaires. En particulier, ce montage original fonctionne en comptage de photons, au contraire des montages traditionnels utilisant des détecteurs analogiques, ce qui permet *a priori* un net gain en sensibilité. Un point essentiel de mon

travail de thèse a consisté à déterminer les conditions expérimentales optimales pour mesurer optiquement les potentiels d'action individuels émis par chaque cellule avec ce type de microscope. A cette fin, j'ai entrepris un effort expérimental et de simulation pour analyser et optimiser le rapport signal sur bruit de ce nouveau type de microscope à deux photons entièrement numérique. A cet effet j'ai profondément modifié le système de détection du microscope en tenant compte des résultats de ces simulations. Des modifications ont également été apportées dans le but d'améliorer la facilité d'utilisation pour des expériences *in vivo*.

I. Introduction

I.1. Le système tactile des vibrisses chez le rat

I.1.1 Le rat

Les Neurosciences utilisent de nombreux organismes modèles selon les études menées: C.Elegans, le poisson zèbre, le xénope, la souris, le rat, le chat, les primates ou encore l'Homme lui-même. Au-delà de la projectibilité des résultats d'un point de vue anthropocentrique et dans le but d'éventuelles applications à l'Homme, l'expérimentateur choisit également son organisme modèle en fonction des contraintes expérimentales telles que la manipulabilité (taille, agressivité, facilité à stimuler...) et les outils nécessaires à l'étude (génétique, microscopie...).

Le poisson zèbre présente notamment un grand intérêt pour les études menées à l'aide d'outils de microscopie en raison de ses tissus non diffusants rendant aisée l'investigation optique. Cependant, en vue d'une étude sensorielle intégrative, un organisme modèle doté d'un cortex est plus approprié. Le rat, *Rattus norvegicus*, présente des similitudes avec *Homo sapiens sapiens* : c'est un mammifère doué de capacités cognitives développées, ayant des interactions sociales etc. Sa gestation courte, sa petite taille et son caractère peu agressif par rapport à la souris en font un animal facile à manipuler dans le cadre d'une étude *In Vivo* (gestion de l'animalerie, chirurgie...). Bien que son cortex soit moins développé que celui de l'Homme ou des primates, que les outils génétiques soient moins développés que chez la souris ou encore que ses neurones soient moins accessibles optiquement que ceux du poisson zèbre, le rat est l'organisme modèle idéal pour notre étude. En effet, celle-ci ne nécessite pas l'utilisation d'outils génétiques ; la microscopie à deux photons permet un bon accès optique à l'activité neuronale de tissus diffusant tels que le cortex du rat et ce dernier présente dans sa partie sensorielle une zone dite « à tonneaux » facilement localisable et intégrant l'activité nerveuse d'un organe sensoriel multi unitaire lui-même facile à stimuler: les vibrisses.

I.1.2 Les vibrisses : un organe sensori-moteur

Description anatomique

Le rat présente de chaque côté du rostre un ensemble de moustaches appelées vibrisses. Correspondant à des formations pileuses, les vibrisses se distinguent des autres poils par un certain nombre de propriétés (Ahl 1986). Déployées de part et d'autre du rostre sur la lèvre supérieure, elles se répartissent en deux catégories : les micro et les macro-vibrisses. Les premières sont nombreuses, de petites tailles (de 0,1 à quelques millimètres pour les plus grandes) et localisées à proximité immédiate de la bouche en position frontale (Brecht, Preilowski et al. 1997). Les macro-vibrisses dites mystaciales sont beaucoup plus longues (plusieurs centimètres), disposées en position latérale et

s'organisent suivant un réseau d'arcs verticaux et de rangées horizontales bien définis et identiques d'un rat à l'autre (Ibrahim and Wright 1975). Les trente-neuf principales macro-vibrisses sont nommées en fonction de leur position : une lettre variant de A à E notifie la rangée (A étant la rangée supérieure et E la rangée inférieure) et un chiffre variant de 1 à 7 notifie l'arc (1 étant l'arc le plus caudal et 7 l'arc le plus rostral). Quatre grandes vibrisses appelées *straddlers* ou *grecques* (α , β , γ et δ) sont intercalées entre les rangées en position postérieures.

Particulièrement vascularisé et innervé, le complexe follicule sinus où s'insère chaque vibrisse (Rice, Fundin et al. 1997) possède une musculature striée commandée de manière autonome (Haidarliu, Simony et al. 2010) faisant d'elle un organe sensori-moteur actif (Hill, Bermejo et al. 2008).

Utilisation comportementale

Animal nocturne, le rat utilise ses vibrisses un peu à la manière dont un homme utiliserait ses mains pour appréhender son environnement et se mouvoir dans une pièce sombre. En effet, les vibrisses jouent un rôle primordial pour l'acquisition d'informations spatiales telles que la localisation d'objets, la détection de leur forme et de leur texture ou encore l'évaluation de distances (Diamond, von Heimendahl et al. 2008). Par ailleurs, les rats vivant en communauté, ils se servent également de leurs vibrisses dans le cadre de leurs interactions sociales.

Lors d'une tâche comportementale, le rat positionne ses vibrisses au contact de l'objet palpé. Elles permettent de transmettre une perturbation mécanique provoquée par la rencontre d'un objet jusqu'aux récepteurs sensoriels situés au niveau des follicules. Pour comprendre cette étape de transduction mécanique par les vibrisses de l'information tactile, leurs propriétés physiques et surtout mécaniques ont été étudiées (Hartmann, Johnson et al. 2003) : flexibles, de longueur variable selon leur position et d'une épaisseur de l'ordre de 100 μm , elles présentent des fréquences de résonance différentes en fonction de leur identité (de 100 Hz à 1kHz). Comprendre comment ces propriétés mécaniques sont impliquées dans la transduction du signal tactile est un sujet d'étude actif (Scheibert, Leurent et al. 2009; Boubenec, Shulz et al. 2012). Lors de tâches exploratoires, le rat engage le plus souvent plusieurs vibrisses simultanément. Des expériences de navigation dans un labyrinthe (Vincent 1912), d'évaluation de distance (Hutson and Masterton 1986) ou de largeur de passage (Krupa, Matell et al. 2001) ont démontré que bien que l'utilisation d'une seule vibrisse suffisait au rat pour accomplir ces tâches, l'utilisation de l'ensemble des vibrisses augmentait nettement la performance tout en diminuant le temps d'apprentissage. Par ailleurs, si le rat est capable de détecter une texture (rugosité) sur une surface avec une seule vibrisse, en revanche il lui en faut au moins deux pour discriminer deux textures différentes, la performance de discrimination s'améliorant nettement avec le nombre de vibrisses laissées au rat (Carvell and Simons 1995). Les vibrisses composent donc un organe sensori-moteur formé de plusieurs unités en interaction : l'information sensorielle est multi vibrissale. De manière analogue les primates et l'homme discriminent des textures en parcourant une surface du bout des

doigts ; les vibrisses seraient alors analogues aux doigts à l'échelle de la main (Gamzu and Ahissar 2001) ou encore des empreintes digitales à l'échelle du doigt (Prevost, Scheibert et al. 2009).

Contrairement à celles du chat, les vibrisses du rat sont mobiles et contrôlées activement. Ainsi lors d'une démarche exploratoire, le rat impose à ses vibrisses une oscillation antéropostérieure de grande amplitude à une fréquence comprise entre 5 et 10 Hz (Welker, Johnson et al. 1964; Carvell and Simons 1990; Knutsen, Biess et al. 2008). Des expériences de suppression du *whisking* par lésion des nerfs moteurs faciaux ont démontré sa nécessité lors de la détermination de positions spatiales d'objets, en particulier suivant la direction horizontale, direction du mouvement de *whisking* (Knutsen, Biess et al. 2008). Ce comportement oscillatoire appelé *whisking* bien que fréquent n'est cependant pas systématique (Krupa, Matell et al. 2001) et n'est pas nécessaire à la plupart des tâches autres que celles décrites précédemment.

Lors d'une étude sur animal anesthésié, il existe des techniques de *whisking* artificiel généré par stimulation électrique du nerf facial (Zucker and Welker 1969; Arabzadeh, Zorzin et al. 2005) afin de placer le système dans les conditions les plus proches possibles de la situation de *whisking* actif ou naturel. Dans le cadre d'une étude de l'intégration sensorielle multi vibrissale et du système de codage de l'information, une stimulation passive des vibrisses est suffisante voire préférable dès lors que l'ensemble des paramètres de la stimulation (vitesse, amplitude, direction...) sont maîtrisés. En effet, d'une part l'activité neuronale varie considérablement selon que le *whisking* est naturel ou artificiel (Szwed, Bagdasarian et al. 2003), d'autre part le rat adapte sa stratégie d'exploration multi vibrissale selon la tâche demandée (Carvell and Simons 1990) faisant ainsi varier le nombre de vibrisses interagissant et le type de contact de chacune d'elles. Dès lors, il est important d'appliquer des stimulations parfaitement contrôlées afin d'étudier l'interaction entre les signaux encodés.

Dès lors que l'ensemble des caractéristiques du stimulus appliqué à une vibrisse est encodé par les mécanorécepteurs présents au niveau de son follicule puis transmis jusqu'au cortex, la connaissance du chemin anatomique afférent apparaît nécessaire.

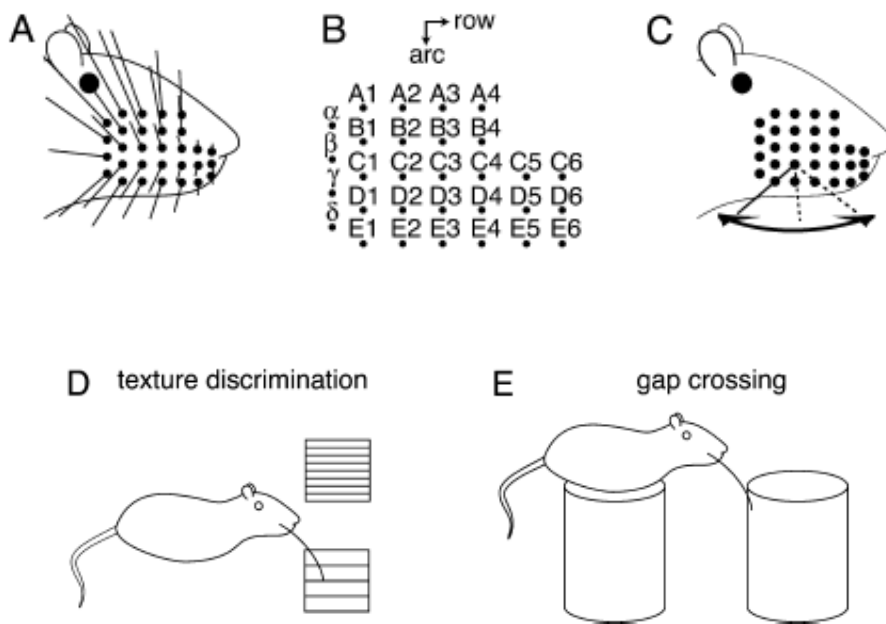


Figure I.1 : Organisation et utilisation comportementale des vibrisses (Petersen et al, 2003)

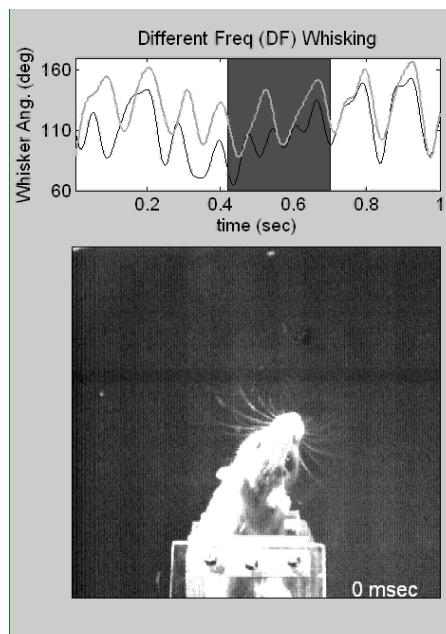


Figure I.2 : Comportement de whisking (Hartmann).

De la vibrisse au cortex : chemin anatomique afférent

Depuis la vibrisse jusqu'au cortex, l'information est transmise suivant un chemin anatomique passant par plusieurs relais représentés sur la Figure I.3. Ainsi, après les nerfs vibrissaux, l'information sensorielle transite par le ganglion trigéminal d'où partent différentes voies passant par les différents noyaux trigéminaux, le thalamus et aboutissant jusqu'au cortex.

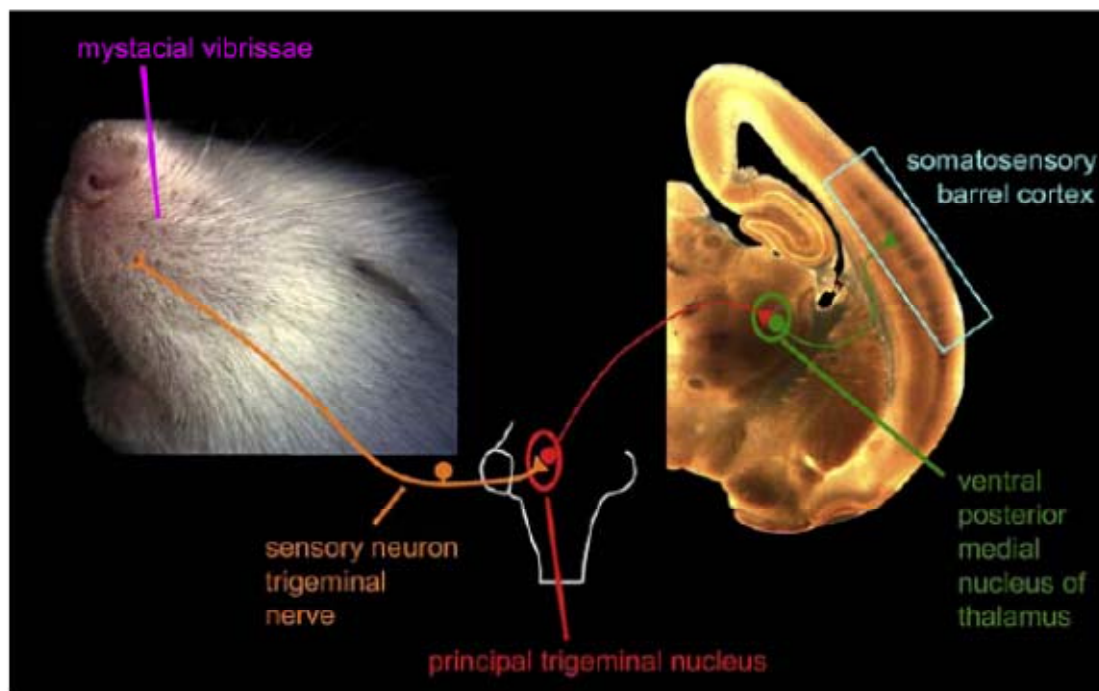


Figure I.3 : Chemin anatomique afférent (Petersen 2003)

Chaque vibrisse émane d'un *follicule-sinus*, structure complexe composée du follicule épidermique et d'un sinus sanguin encapsulé (Rice, Mance et al. 1986). Tout le follicule est innervé par la branche *infra* orbitaire de la division maxillaire du nerf trigéminal. Cette innervation se compose d'un nerf unique large et profond qui pénètre dans la capsule au niveau du sinus annulaire et d'un groupe de nerfs vibrissaux de surface dont les terminaisons se situent au niveau de l'ouverture et du col du follicule-sinus (Rice, Fundin et al. 1997). Le nerf profond produit de nombreuses terminaisons dont celles dites *de Merkel* qui constituent des mécanorécepteurs sensibles à la pression, celles dites *lancéolées* situées autour du poil dans la gaine et sensible à l'étirement et celles dites *de Rufini*, elles aussi sensibles à l'étirement mais présentes en moins grande quantité. Les neurones sensoriels primaires sont hautement sensibles à la direction et à la vitesse de déflexion de la vibrisse et possèdent des champs récepteurs mono-vibrissaux. Les corps cellulaires de ces neurones sensoriels sont situés dans le ganglion trigéminal (GV). Ils se projettent dans le tronc cérébral, dans 4 noyaux trigéminaux : le noyau trigéminal principal (PrV) situé antérieurement et des trois sous-noyaux interpolaires (SpVi), caudal (SpVc) et oral (SpVo). A l'exception de ce dernier, les trois autres structures du noyau

trigéminal présentent une représentation somatotopique du réseau de vibrisses appelée *barrelettes* (Dykes 1975). Chaque barrelette est une zone en forme de tonneau composée d'une forte densité de neurones correspondant à une vibrisse en particulier. En effet, peu de neurones étendent leur arborisation dendritique aux barrelettes voisins (Ma, Beck et al. 2006).

Les projections du noyau trigéminal sur le thalamus constituent une première étape dans la transmission de l'information sensorielle des vibrisses vers le cortex. Les chemins lemniscal, paralemniscal et extralemniscal constituent les trois voies principales contribuant chacune au transport d'informations différentes :

- Le chemin lemniscal véhicule majoritairement l'information mono vibrissale. Il s'agit du chemin classique vibrisse-barrelette-barreloïde contenant l'information spatiale sur le mouvement de la vibrisse qui est défléchi. (Diamond, Armstrong-James et al. 1992) Les neurones de cette voie ont des temps de latence courts permettant une transmission rapide de l'information.
- Le chemin paralemniscal transporte l'information multi vibrissale ainsi que les informations temporelles et serait associé aux tâches impliquant le *whisking* (Sosnik, Haidarliu et al. 2001). Les neurones de cette voie ont des temps de latence plus longs et véhiculent des réponses de faible amplitude.
- Le chemin extralemniscal convoie uniquement l'information de contact de la vibrisse et participerait donc lors de tâches de localisation d'objets (Pierret, Lavalée et al. 2000; Yu, Derdikman et al. 2006).
- Il existe une quatrième voie récemment décrite (Urbain and Deschenes 2007) qui passe par la tête de VPM et par POM et qui possèdent des champs récepteurs multi-vibrissaux.

L'organisation anatomique ainsi que les principales caractéristiques de ces voies sont présentées sur la Figure I.4. Les cellules du ganglion trigéminal (GV) qui innervent une vibrisse se projettent sur chacun des noyaux trigéminaux. Chaque voie est issue d'un type cellulaire différent, transite par une région particulière du thalamus et se projette sur différentes aires corticales ou différentes couches d'une même aire corticale.

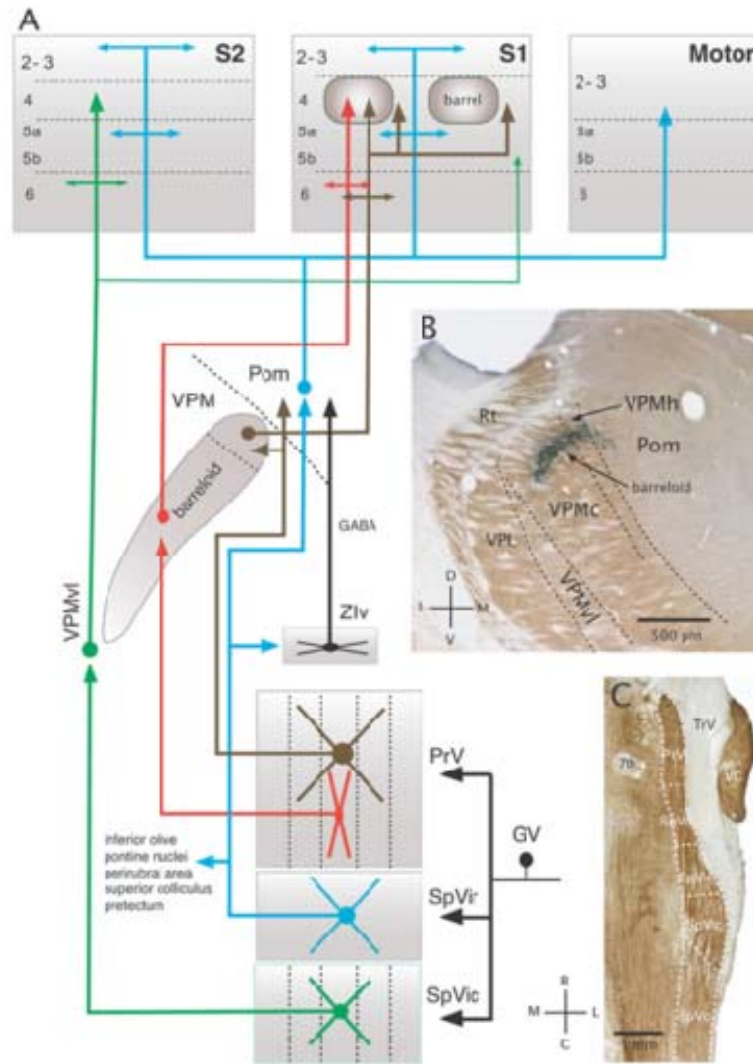


Figure 1.4: Organisation anatomique des trois voies principales de traitement de l'information vibrissale (Urbain and Deschenes 2009).

(A) Schéma de connectivité : voie lemniscale (rouge), voie para lemniscale (bleu) et voie extra lemniscale (vert). Le diagramme de connectivité résume les principales caractéristiques de ces voies. Il existe une quatrième voie (marron) qui passe par la tête des barréloïdes.

(B) : Photographie (marquage à la cytochrome oxydase) des différentes régions thalamiques servant de relais à chacune des voies (zones délimitées par les pointillées). Le marquage à la cytochrome oxydase révèle également un barréloïde qui a été marqué par injection de Fluorogold dans le tonneau C2. D, V, M, L correspondent respectivement aux directions dorsale, ventrale, médiale, et latérale.

(C) : Photographie (marquage à la cytochrome oxydase) présentant les différents noyaux trigéminaux d'où émergent les différentes voies. R, C, M, L, correspondent respectivement aux positions rostrale, caudale, médiale, et latérale. Abréviations: 7th, zone du noyau facial ; TrV, zone spinale trigéminal; VC, noyau cochléaire ventral; VPL, noyau ventral postérieur latéral.

Au-delà du noyau trigéminal, la majorité des axones des neurones de PrV croise la ligne médiane et se projettent dans le noyau ventral postéro médian (VPM) du thalamus où la représentation somatotopique de la matrice vibrissale est également présente : les axones provenant d'un barrette se projettent sur les *barréloïdes*, chaque barreloïde étant composé d'une forte densité de neurones (environ 250) et correspond lui aussi à une vibrisse précise (Veinante and Deschenes 1999). Les caractéristiques de la stimulation tactile encodée préalablement sont globalement préservées lors de la projection de PrV sur VPM (Minnery, Bruno et al. 2003). Les cellules minoritaires de PrV présentant un champ récepteur multi vibrissale se projettent principalement dans le groupe postérieur du Thalamus (POm) et dans la tête de VPM.

Le troisième relais dans la transmission de l'information tactile est la connexion thalamo-corticale. La somatotopie en tonneaux évoquée dans les précédentes structures se retrouve également dans le cortex : les axones issus des barréloïdes du thalamus se projettent principalement sur des structures similaires appelées *tonneaux* et situées en couche IV du cortex. On parle alors du *cortex à tonneaux*. Les projections lemniscales du VPM du thalamus se projettent principalement sur les tonneaux correspondants mais atteignent également les couches II/III, Vb et VI du cortex. Les projections paralemniscales du POm du thalamus se projettent dans la couche IV (tonneaux et septa) ainsi que dans les couches II/III et Va, mais aussi dans S2 et dans le cortex moteur. Enfin, les terminaisons de la voie extralemniscale se retrouvent au niveau du cortex somato-sensoriel secondaire (SII) ainsi que dans les couches inférieures du cortex sensoriel primaire. Enfin, la 4^{ème} voie se projette en couche IV à la fois dans les tonneaux et dans les septa, et en couche 6.

I.1.3 Le cortex somato sensoriel

Le cortex somato sensoriel primaire S1, structure indispensable aux processus complexes tels que la perception tactile, possède une structure anatomique particulière qui nécessite d'être détaillée. Chez le rat, le cortex à tonneaux S1bf se situe en couche IV du cortex somatosensoriel primaire dont il occupe une grande partie (figures I.5 et I.6).



Figure I.5 : Ratonculus, représentation imagée des différents sens tactiles proportionnellement à leur représentation dans le cortex somato sensoriel primaire. Le cortex à tonneaux est particulièrement volumineux (Petersen et al 2003).

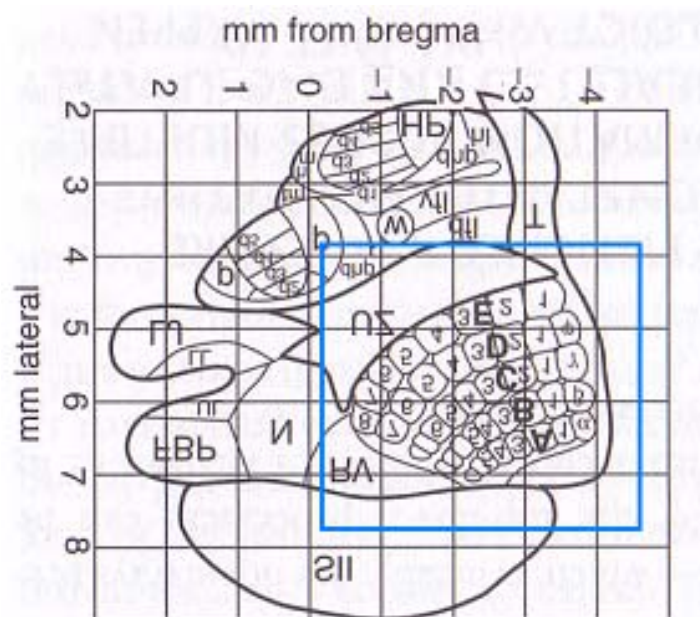


Figure I.6 : Coordonnées stéréotaxiques de S1bf.

Le cortex à tonneaux

Chacun des barréloïdes du thalamus se projette donc sur un tonneau en couche IV du cortex somatosensoriel primaire (S1) (Diamond 1995; Fox 2008). Un tonneau correspond à un cylindre mesurant environ 250 μm de hauteur pour une section d'environ 300 μm de diamètre chez le rat adulte ce qui fait que le cortex à tonneau occupe 20% de la surface totale de S1 (Welker 1971). La densité neuronale y est particulièrement élevée, environ 5000 neurones par tonneau, ce qui rend cette zone facilement identifiable en histologie, les tonneaux étant séparés les uns des autres par des zones de plus faible densité cellulaire appelées *septa*. Dans un tonneau, les corps cellulaires forment des agrégats qui donnent un aspect granulaire, d'où le nom de la couche IV. Les neurones d'un tonneau sont associés verticalement à tous les autres neurones des couches supra et infra granulaires situés immédiatement au-dessus et au-dessous du tonneau en question définissant ainsi une colonne corticale (Mountcastle 1957; Mountcastle 1997) qui intègre l'information sensorielle tactile provenant de la vibrisse contra-latérale associée.

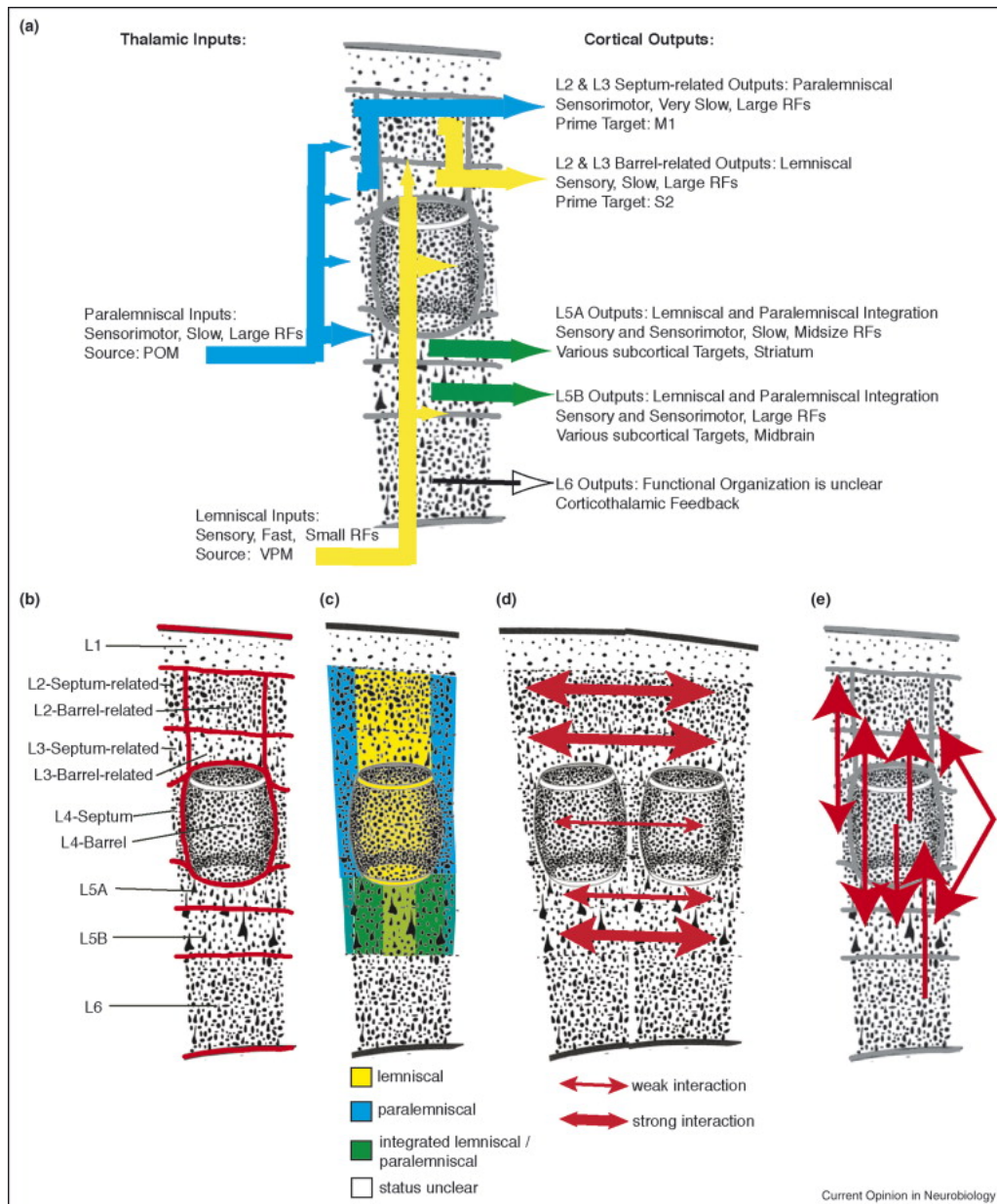


Figure I.7 : Connexions thalamo-corticales et cortico-corticales (Brecht 2007).

(a) A gauche, entrées thalamiques. L'épaisseur des flèches indique la force relative des entrées thalamiques. A droite, les efférences du cortex à tonneaux. Abréviations: L, couche; RF, champ récepteur; M1, cortex moteur primaire (vibrisses); S2, cortex somato-sensoriel secondaire; VPM, noyau ventral postéro médial du thalamus; POM, noyau postéro médial du thalamus.

(b) Couches et compartiments de la colonne corticales. Les lignes rouges définissent des compartiments pour lesquels des différences à la fois physiologiques et anatomosynaptique ont été démontrées.

(c) Voies lemniscale et para lemniscale au sein de la colonne corticale.

(d) Connectivité horizontale entre colonnes corticales.

(e) Connectivité verticale au sein de la colonne. Les entrées intra corticales en couches VI ne sont pas représentées car non caractérisées.

Somatotopie

Comme pour les vibrisses, le cortex à tonneaux présente une parfaite reproductibilité anatomique d'un rat à l'autre. En effet, une détermination génétique (Vanderhaeghen, Lu et al. 2000; Fukuchi-Shimogori and Grove 2001; Ohsaki, Osumi et al. 2002), ainsi qu'une expérience tactile précoce lors du développement (Van der Loos and Woolsey 1973; Van der Loos, Welker et al. 1986) permettent le développement d'un cortex constant en terme du nombre, de la taille et de la localisation des tonneaux. On y retrouve ainsi aisément les trente-neuf tonneaux correspondant aux vibrisses principales contra-latérales (Figure I.8, rangées A à E, arcs 1 à 7 et les *straddlers*). L'association des neurones au sein d'une colonne corticale est tant anatomique que fonctionnelle, cependant il existe également une connectivité entre colonnes accréditant la théorie d'une intégration multi vibrissale dans le cortex (cf. figure I.7).

Chaque tonneau intègre en effet préférentiellement l'information tactile afférant de la vibrisse qui lui est associée (Woolsey and Van der Loos 1970; Welker 1971) mais les neurones d'un tonneau cortical intègrent également l'information sensorielle provenant d'autres vibrisses, notamment de celles qui sont immédiatement voisines de la vibrisse principale affectée au tonneau en question (Simons 1978; Armstrong-James and Fox 1987). D'autre part, chez le rat adulte, le fait de léser une vibrisse n'entraîne pas la disparition du tonneau correspondant, mais une modification dans l'organisation des champs récepteurs de ses neurones (Glazewski, McKenna et al. 1998; Polley, Chen-Bee et al. 1999; Petersen, Brecht et al. 2004) mettant ainsi en évidence l'influence des connexions entre colonnes sur l'organisation fonctionnelle.

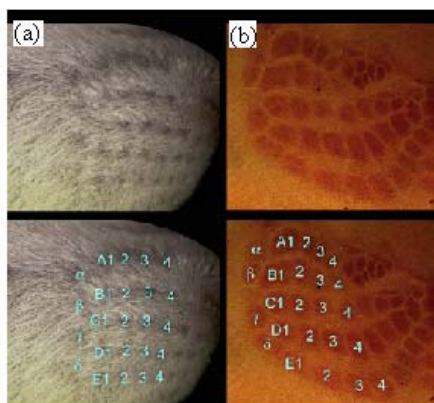


Figure I.8 : Somatotopie (Petersen 2003).

(a) Position des vibrisses sur le museau du rat : colonnes 1 à 4, rangées A à E et les *straddlers*.

(b) Coupe tangentielle en couche IV du cortex somato sensoriel (marquage en cytochrome oxydase). Chaque tonneau cortical correspondant aux vibrisses de (a) y est distinctement représenté

Composition cellulaire

Le cortex du rat est composé de six couches : les couches supra-granulaires (couches I, II, et III), la couche IV dite *granulaire* et les couches profondes infra-granulaires (couches V et VI). Elles se différencient les unes des autres par la nature et la taille des cellules qui les composent, par leur densité neuronale et par leur connectivité. La couche I est très superficielle est particulièrement peu dense en corps cellulaires. Les couches II et III sont peu dissociables, on parle souvent de la couche II/III. Les couches infra granulaires sont quant à elles divisées en sous-couches : la couche Va est légèrement moins dense que la couche Vb qui comporte plus de cellules pyramidales. Enfin, les couches les plus profondes sont les couches VIa et VIb (Brecht 2007).

Une colonne corticale compte environ 20 000 neurones qui se répartissent sur les différentes couches de la façon suivante : 0,5% en couche I, 25% en couche II/III, 30% en couche IV, 10% en couche Va, 10% en couche Vb et 25% en couche VI (Meyer, Wimmer et al. 2010). Les neurones excitateurs sont principalement glutamatergiques et représentent 70 à 80% des neurones corticaux. Les cellules excitatrices pyramidales se retrouvent majoritairement dans les couches II/III, V et VI, bien que présentes également en couche IV où les cellules excitatrices sont des cellules étoilées (cellules étoilées à épine et cellules pyramidales étoilées) (Feldmeyer, Lubke et al. 2002; Wang, Toledo-Rodriguez et al. 2004). Les neurones inhibiteurs quant à eux sont essentiellement GABAergiques (Keller 1995; Markram 1997; Wang, Toledo-Rodriguez et al. 2004; Fox 2008).

Les différentes couches du cortex récupèrent les entrées thalamiques ainsi que les connexions internes à la colonne corticale auxquelles viennent s'ajouter des connexions entre colonnes adjacentes

Connectivité intra corticale

La connectivité intra corticale (Figure I.7.e) peut donc être interne à la colonne, on parle alors de connectivité verticale, par opposition à la connectivité horizontale entre colonnes (Petersen and Sakmann 2001).

La couche IV recevant la majorité des connexions thalamiques du noyau ventro-postéro-médian et projetant ses propres axones dans toutes les autres couches du cortex, y compris elle-même, elle est considérée comme le premier relais cortical de l'information afférente des structures sous-corticales. Du fait de la forte inter-connectivité des neurones d'un même tonneau (Egger, Feldmeyer et al. 1999; Feldmeyer, Egger et al. 1999; Lubke, Egger et al. 2000), une stimulation dans la couche IV entraîne prioritairement une activité au sein du dit tonneau (Petersen and Sakmann 2001) dont les neurones ont un champ récepteur qui se réduit principalement à la vibrisse principale. En effet, la connectivité devient faible au niveau des septa et les neurones des tonneaux proches du septum

montrent une tendance à pointer leur arborisation vers l'intérieur du tonneau (Petersen and Sakmann 2000).

Bien que recevant également des entrées thalamiques (Bureau, von Saint Paul et al. 2006; Wimmer, Bruno et al. 2010), les neurones des couches supra et sous granulaires, en particulier ceux des couches II/III et V, présentent une activité avec un retard de quelques ms sur la couche IV après stimulation de la vibrisse principale (Diamond, Armstrong-James et al. 1992). La connectivité entre la couche IV et la couche II/III dont les cellules sont observables optiquement *in vivo* est unidirectionnelle (Bureau, von Saint Paul et al. 2006) et verticale : les neurones des couches II/III reçoivent les axones du tonneau de leur colonne et ne renvoient pas ou peu leurs propres axones vers la couche IV. Il est à noter que certains de ces axones traversent la couche IV pour établir des connexions avec la couche V qui reçoit d'ailleurs des entrées de l'ensemble de la colonne.

En fait, la plus grandes parties des axones des neurones des couches II/III se projettent sur eux-mêmes ainsi que sur leurs homologues des colonnes voisines (Petersen and Sakmann 2001) expliquant ainsi leur champ récepteur plus étendu et faisant de la couche II/III un excellent candidat comme substrat de l'intégration multi vibrissale. Cette connectivité horizontale, très marquée en couche II/III, existe également en couche granulaire ainsi qu'en couche V mais elle y est nettement moins forte. Les neurones des tonneaux corticaux envoient effectivement quelques axones horizontaux vers les tonneaux voisins (Staiger, Flaggmeyer et al. 2004) tandis que les cellules pyramidales de la couches V établissent également des connexions avec les colonnes voisines (Reyes and Sakmann 1999; Atzori, Lei et al. 2001). On peut noter par ailleurs que cette propagation horizontale du signal est plus étendue le long des rangées que le long des arcs (Hoeflinger, Bennett-Clarke et al. 1995).

Tant sur le plan théorique qu'expérimental, le système vibrisses/cortex à tonneaux constitue un excellent modèle d'étude de l'intégration sensorielle : il est constitué d'un organe sensoriel multi unitaire facile à stimuler (les vibrisses) qui induit une activité neuronale dans une zone spécifique du cortex elle-même composée de sous-unités et qui plus est facilement accessible et repérable (le cortex à tonneaux). Dans un contexte expérimental, un protocole de stimulations/observations est donc « facile » à mettre en œuvre.

I.2. Champs récepteurs

Le champ récepteur d'un neurone est défini comme l'ensemble des zones sensorielles induisant une activité neuronale lors de leur stimulation. Ainsi dans le système des vibrisses, le champ récepteur d'un neurone donné correspond à l'ensemble des vibrisses induisant une activité cellulaire lors de sa déflexion. Nous pouvons ainsi définir la vibrisse principale comme étant celle induisant le maximum d'activité avec un délai minimal. Cette notion de champ récepteur dépend de la connectivité ainsi que l'état d'éveil (éveillé, anesthésié, état « up » ou « down »...) et des conditions de stimulations

sensorielles. L'étendue du champ récepteur serait donc corrélée au pouvoir d'intégration multi sensoriel de l'unité considérée (Armstrong-James 1995; Simons 1995).

I.2.1 Les champs récepteurs sous-corticaux

Les cellules sous corticales ont des champs récepteurs principalement voire exclusivement mono vibrissaux, proches du complexe follicule-sinus mais ceux-ci s'étendent lorsqu'on avance sur le chemin anatomique.

De part leur position directe en aval de la vibrisse, les cellules des ganglions trigéminaux sont exclusivement mono vibrissales (Zucker and Welker 1969; Gibson and Welker 1983) (Lichtenstein, Carvell et al. 1990). En effet, du point de vue anatomique chaque fibre afférente du ganglion innerve un unique follicule pileux.

Les neurones du noyau trigéminale sont principalement mono vibrissaux, cependant il existe une inter connectivité importante entre les différents noyaux trigéminaux (Jacquin, Wiegand et al. 1990; Furuta, Urbain et al. 2010) ; si bien qu'un peu plus de 20% des cellules présentent un champs récepteur de plusieurs vibrisses (Jacquin, Stennett et al. 1988; Chiaia, Rhoades et al. 1991; Chiaia, Zhang et al. 2000; Minnery and Simons 2003).

Dans le thalamus, les neurones s'organisent en deux populations : celles mono vibrissales situées au cœur du barréloïde et celles situées sur les extrémités du barréloïde et qui ont un champ récepteur multi vibrissal centré autour d'une vibrisse principale. (Simons and Carvell 1989; Diamond 1990; Armstrong-James and Callahan 1991; Brecht and Sakmann 2002; Timofeeva, Merette et al. 2003).

Bien que le caractère multi vibrissale de l'intégration sensorielle existe déjà en amont du cortex somato sensoriel, à son niveau que le degré d'intégration se complexifie.

I.2.2 Champs récepteurs corticaux infra- et supra- laminaires

Nous avons vu précédemment que la taille des champs récepteurs variait au sein de la colonne corticale : petite en couche IV, elle s'étend fortement en couche II/III. Lorsque le champ récepteur d'un neurone est multi vibrissal, celui-ci s'organise presque toujours (de manière plus ou moins symétrique) autour d'une vibrisse principale (Figure I.9) laquelle provoque une activité maximale avec un temps de réponse plus court lors de sa stimulation (Ego-Stengel, Mello e Souza et al. 2005; Le Cam, Estebanez et al. 2011).

En couche IV, les champs récepteurs des neurones des tonneaux sont principalement mono vibrissaux (Simons 1978) tandis que les champs récepteurs des neurones situés dans les septa sont beaucoup plus étendus (Armstrong-James and Fox 1987).

En couche II/III, les neurones répondent à plusieurs vibrisses (Armstrong-James and Fox 1987; Ghazanfar and Nicolelis 1999) intégrant ainsi l'information entre colonnes du fait des projections entre tonneaux dans cette zone. En ce qui concerne les couches sous laminaires, les champs récepteurs sont encore plus étendus pouvant aller jusqu'à 16 vibrisses (Moore and Nelson 1998; Ghazanfar and Nicolelis 1999; Zhu and Connors 1999; Brecht and Sakmann 2002).

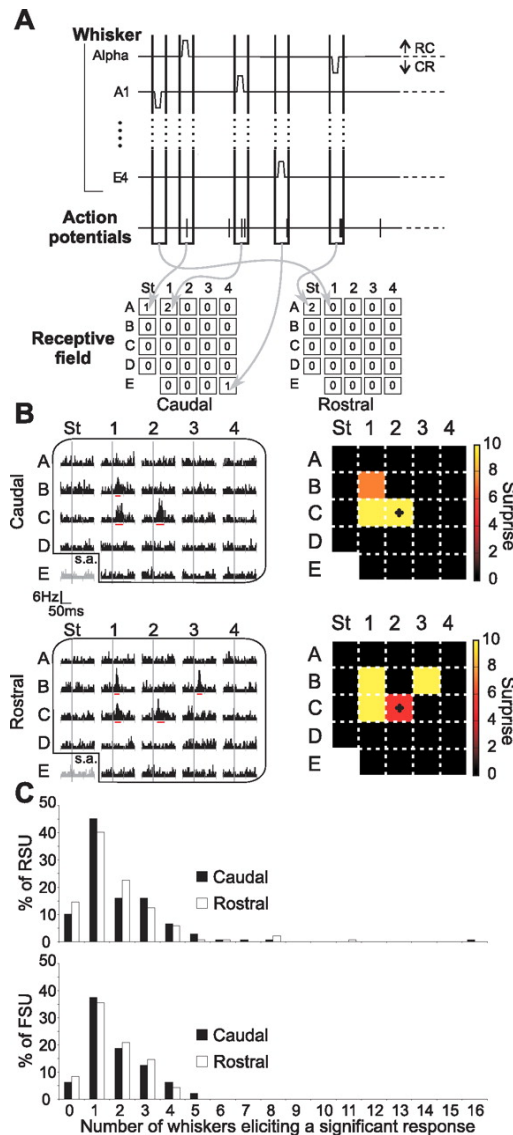


Figure 1.9 : Analyse en bruit épars des champs récepteurs corticaux (Le Cam, Estebanez et al. 2011).

(A) Représentation schématique du bruit épars appliqué en stimulation et de l'analyse en corrélation directe. Des stimulations impulsionnelles (montée : 10ms, plateau : 10ms, descente : 10ms) sont appliquées aléatoirement aux 24 vibrisses principales suivant les deux directions rostro-caudale et caudo-rostrale.

(B) Réponse d'un neurone situé en couche IV du tonneau C2. A gauche, le PSTH pour les 24 vibrisses. A droite, représentation du champ récepteur correspondant. La vibrisse principale anatomique est symbolisée par la croix noire.

(C) Histogramme du nombre de vibrisses induisant une réponse significative des cellules (RSU et FSU) des couches II/III, IV et V lors de leur stimulation dans la direction rostrale ou caudale.

I.2.3 Sélectivité directionnelle

La déflexion d'une ou plusieurs vibrisses entraîne la propagation d'une activité neuronale tout au long du chemin afférent évoqué précédemment jusqu'au cortex somato sensoriel. Cependant cette activité est très dépendante des caractéristiques de stimulation telle que la vitesse, l'accélération, la répétition et surtout la direction de la déflexion (Simons 1978; Kida, Shimegi et al. 2005; Wilent and Contreras 2005; Andermann and Moore 2006; Puccini, Compte et al. 2006; Le Cam, Estebanez et al. 2011). Dans le cadre d'une étude directionnelle mono ou multi vibrissale, on peut ainsi définir un critère de préférence directionnelle appelé « tuning ratio ». En divisant l'espace des directions de stimulation en N directions, l'angle préférentiel d'un neurone est donné par le vecteur $\mathbf{P} = \sum_{i=1:N} \mathbf{x}_i$ avec \mathbf{x}_i le vecteur d'amplitude x_i donnant l'amplitude de réponse du neurone pour une déflexion suivant la direction θ_i . Pour ce neurone, le « tuning ratio » est défini de la manière suivante :

$$TR = \frac{|\mathbf{P}|}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i} \quad (\text{Eq. I.1})$$

Variant de 0 à N, sa valeur donne ainsi une indication sur la force du « tuning » suivant la direction en question. Cette propriété de sélectivité à la direction de stimulation présente dès les cellules ganglionnaires (80% des cellules dans les ganglions trigéminaux) se propage tout au long du chemin anatomique jusqu'au cortex somato sensoriel où les propriétés du champ récepteur (taille, symétrie autour de la vibrisse principale, temps de réponse) varient avec la direction de stimulation (Figure I.10)

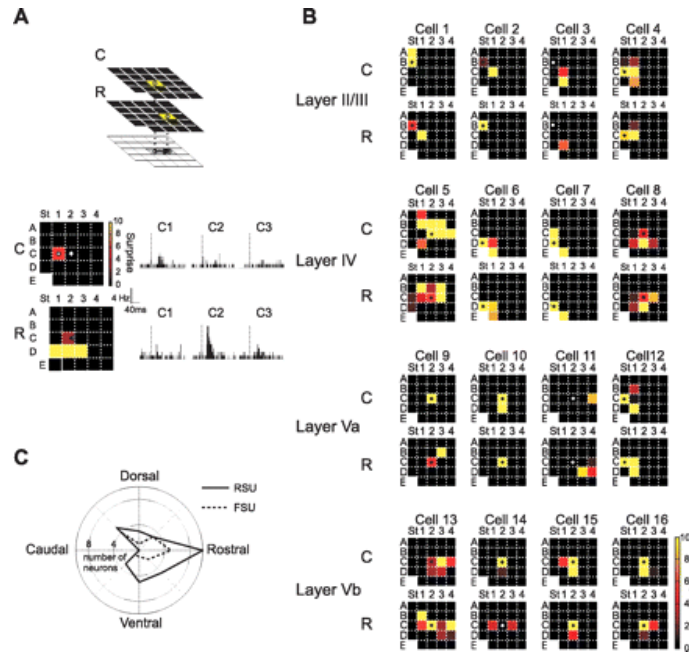


Figure I.10 : Différences entre les champs récepteurs selon la direction de stimulation (Le Cam, Estebanez et al. 2011). (A) Définition du vecteur déplacement (flèche noir) représentant le décalage du centre de masse du champ récepteur selon la direction de stimulation caudo-rostrale R ou rostro-caudale C. (B) Champs récepteurs C et R pour 16 cellules de différentes couches. (C) Distribution polaire des vecteurs déplacements. On peut noter la présence d'un décalage fort vers la direction caudo-rostrale.

I.2.4 Organisation spatiale des neurones

Les cellules du VPM ayant elles-mêmes une préférence directionnelle marquée ainsi qu'une organisation spatiale suivant celle-ci (Timofeeva, Merette et al. 2003) et du fait de la convergence des entrées thalamiques en couche IV, localement au sein d'un tonneau, les neurones ayant les mêmes préférences directionnelles sont regroupés en micro colonne (Bruno, Khatri et al. 2003) ; (Andermann and Moore 2006) (figure I.12). Ce regroupement spatial des neurones en fonction de leur sélectivité directionnelle observé par Moore et al. (Figure I.11) lors d'enregistrements électrophysiologiques en couches II/III a été mis en cause par les travaux de Kerr qui ne l'observe pas lors d'enregistrements en microscopie à deux photons en couche II/III sur des animaux jeunes (Figure I.12 : (Kerr, de Kock et al. 2007)). Cette ambiguïté a été levée par les travaux de Kremer et al. dans notre laboratoire qui a démontré que cette organisation est bien absente en couche II/III chez des animaux jeunes (P32-P39) mais apparaît chez les animaux plus âgés (P81-P112) (Figure I.13 : (Kremer, Leger et al. 2011)) laissant présager une émergence tardive de cette ségrégation en couche II/III. En analysant la répartition laminaire des cellules ayant des préférences directionnelles, il apparaît que celles-ci sont deux fois moins présentes dans les couches II/III (19%) que dans les couches IV et V/VI (42% pour chacune) (Kida, Shimegi et al. 2005).

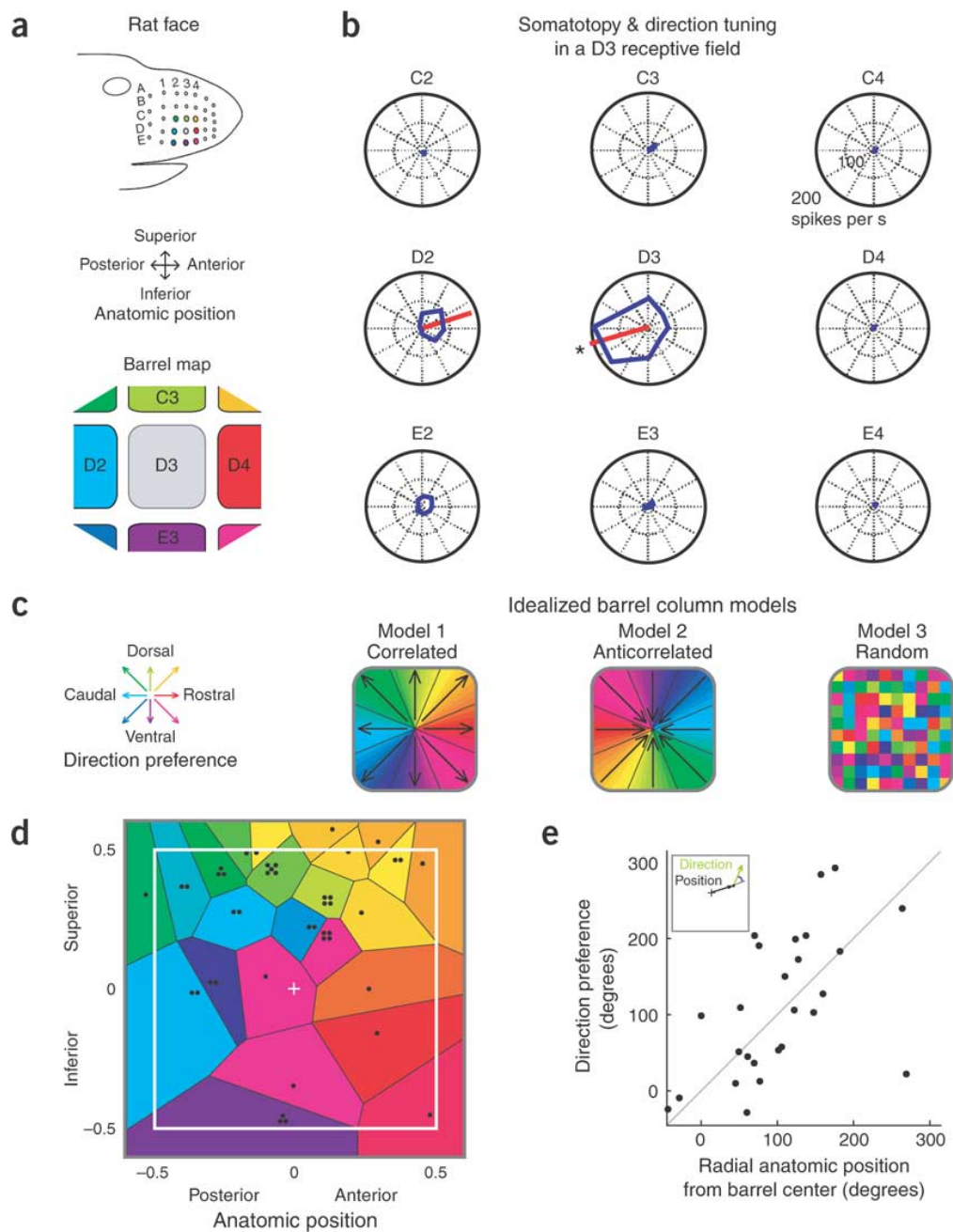


Figure I.11 : Organisation spatiale des neurones des couches II/III en fonction de leur sélectivité à la direction de stimulation (Andermann and Moore 2006).

(a) Définition du code couleur pour la direction de stimulation (vibrisses et tonneaux). Les analyses n'ont porté que sur les cellules ayant des D3 pour vibrisses principales du point de vue fonctionnel.

(b) Exemple de champ récepteur directionnel centré sur D3.

(c) Trois modèles prédictionnels possible de la relation entre direction préférentielle et position au sein de la colonne corticale.

(d) Carte représentant la direction préférentielle des neurones (couleur) en fonction de leur position au sein de la colonne corticale.

(e) Direction préférentielle en fonction de la position radiale au sein du tonneau cortical.

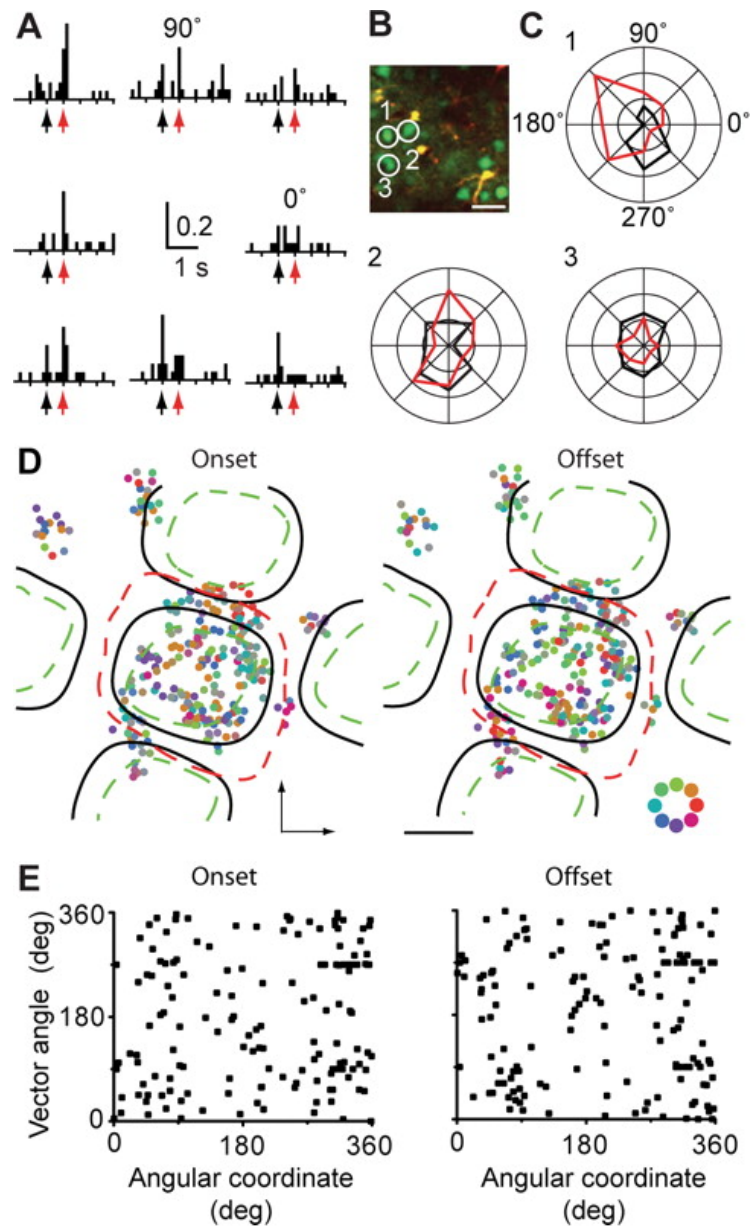


Figure I.12 : Absence de corrélation entre position des neurones et direction de stimulation vibrissale en couche II/III chez le rat jeune (P25-P35) (Kerr, de Kock et al. 2007).

(A) Réponse moyenne d'un neurone à 223 déflexions vibrissales suivant huit directions (0–315°) (neurone 1 dans (B) (C)).

(B) Image en microscopie à deux photons de neurones (en vert) et d'astrocytes (orange). Barre d'échelle : 30 μm .

(C) Représentation de l'activité des neurones présentés en (B) en fonction de la direction de stimulation.

(D) Sélectivité directionnelle (couleur) en fonction de la position des neurones au sein du tonneau cortical. On note l'absence de corrélation entre sélectivité directionnelle et position des cellules. Les arcs sont représentés verticalement et les rangées horizontalement. Barre d'échelle: 200 μm .

(E) Direction préférentielle des neurones en fonction de leur position angulaire.

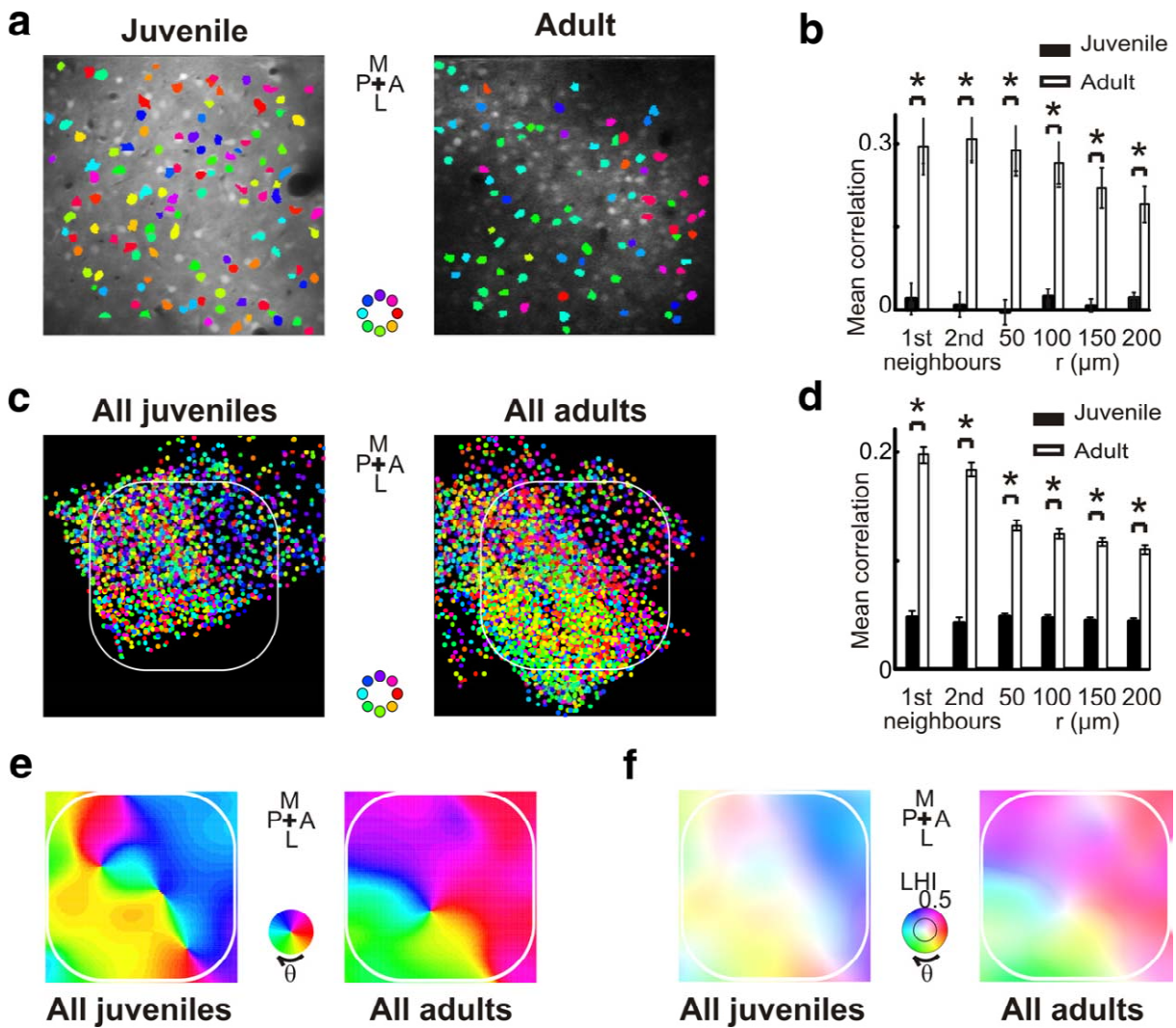


Figure I.13 : Emergence tardive des cartes de sélection directionnelle (Kremer, Leger et al. 2011).

(a) Exemple d'organisation à la sélectivité directionnelle chez un rat jeune (à gauche) et chez un rat adulte (à droite). Chaque point représente un neurone (M, médial; L, latéral; P, postérieur; A, antérieur).

(b) Corrélations moyennes entre les neurones voisins dans le champ représenté en (a).

(c) Superposition de tous les neurones enregistrés selon les coordonnées normalisées au sein du tonneau pour les rats jeunes (à gauche, N = 4 animaux, 29 champs, tonneaux: C2, C3, D2, D3) et pour les rats adultes (à droite, N = 7 animaux, 41 champs, tonneaux: B1, B2, C2, D2 (×3), D3).

(d) Corrélations moyennes entre les neurones voisins sur l'ensemble des champs imagés pour les rats jeunes (noir, N = 29 champs) pour les rats adultes (blanc, N = 41 champs).

(e) Cartes de sélectivité directionnelle filtrées avec un filtre gaussien ($\omega = 0.2$ selon les coordonnées normalisées au sein du tonneau).

(f) Cartes de sélectivité directionnelle filtrées, le niveau de saturation des couleurs représente l'indice d'homogénéité local.

I.2.5 Intégration multi vibrissale

Le rat acquiert l'information sensorielle tactile à l'aide de contacts répétés entre les objets et plusieurs de ses vibrisses (Carvell and Simons 1990; Harvey, Sachdev et al. 2001; Sachdev, Sellien et al. 2001). Pour certaines tâches, le niveau de performance de l'animal dépend de manière cruciale du nombre de vibrisses utilisées (Krupa, Matell et al. 2001; Celikel and Sakmann 2007). L'importance de ce nombre de vibrisses utilisées par l'animal pour accomplir une tâche démontre l'importance de l'intégration spatio-temporelle de l'information.

L'intégration multi vibrissale prend en compte deux paramètres tout aussi important l'un que l'autre : l'aspect spatial, à savoir l'identité de la vibrisse stimulée et la direction de stimulation, et l'aspect temporel, l'intervalle de temps séparant les diverses stimulations. Selon la combinaison de ces deux paramètres, l'interaction pourra être facilitatrice ou inhibitrice

Intégration temporelle

Le temps séparant deux stimulations (ISI pour Inter Stimuli Interval) joue un rôle important : compris entre 0 à 50 ms l'intégration sera suppressive ou facilitatrice tandis qu'au-delà de 50ms il n'y a plus d'interaction (Sachdev, Sellien et al. 2001). La stimulation simultanée de deux vibrisses (ISI=0 ms) entraîne principalement une interaction suppressive au niveau cortical (Simons 1985; Goldreich, Peterson et al. 1998; Shimegi, Ichikawa et al. 1999; Shimegi, Akasaki et al. 2000; Ego-Stengel, Mello e Souza et al. 2005), cependant elles sont réduites dans les couches II/III (Shimegi, Ichikawa et al. 1999; Shimegi, Akasaki et al. 2000).

Les interactions facilitatrices, moins nombreuses ont été observées notamment en couches V, IV et II/III et principalement pour des ISI courts, de l'ordre de 5ms. (Simons 1985; Ghazanfar and Nicolelis 1997; Shimegi, Ichikawa et al. 1999; Shimegi, Akasaki et al. 2000; Ego-Stengel, Mello e Souza et al. 2005).

Par ailleurs, il faut noter que la répétition d'une séquence temporelle entraîne de l'adaptation (Simons 1985).

Intégration multi vibrissale d'ordre élevé

Les premières études multi vibrissales portaient sur la stimulation de deux vibrisses voisines en regardant les effets de potentiation ou d'inhibition. Par la suite d'autres études ont porté sur la stimulation de cinq vibrisses d'une même rangée (Brumberg, Pinto et al. 1996; Rodgers, Benison et al. 2006), de neuf ou seize vibrisses en réseau de 3x3 ou 4x4 (Krupa, Matell et al. 2001; Drew and Feldman 2007). Toutes ces

études étaient limitées par le nombre de vibrisses stimulées (inférieur à 24) et selon les stimulateurs utilisés par la qualité des stimulations elles-mêmes (offset de stimulation, contrôle de la fonction de transfert du stimulateur, directions de stimulation accessibles...). Le développement par l'équipe de Daniel Shulz d'une matrice de stimulation constituée de 24 stimulateurs piézoélectriques 2D parfaitement contrôlés (Figure I.14 : (Jacob, Estebanez et al. 2010)) a fourni un outil idéal pour aborder les questions d'intégration multi vibrissale. Cependant, le problème majeur d'une stimulation à 24 vibrisses réside dans le fait que l'espace des phases à explorer devient immense et non explorable expérimentalement. Une étude préalable réalisée au niveau des vibrisses individuelles par Estebanez et al. (Estebanez, Boustani et al. 2012) a permis de réduire l'espace à explorer. Cette étude est abordée en détail dans les paragraphes suivants.

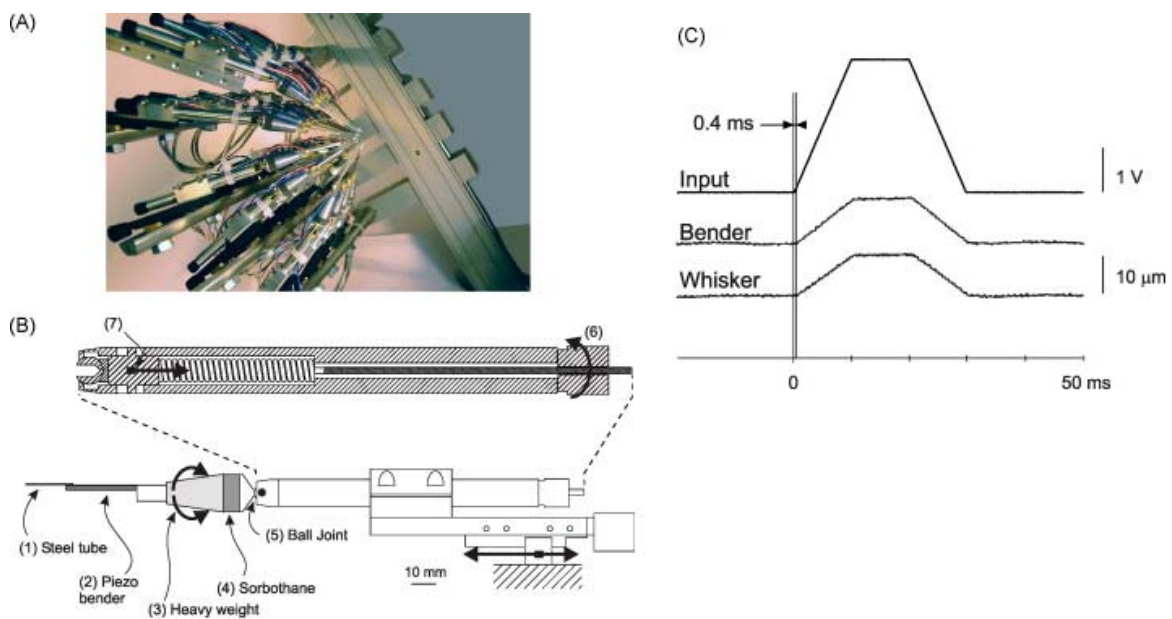


Figure I.14 : Matrice de stimulation des 24 macro vibrisses (Jacob, Estebanez et al. 2010).

(A) Photographie de la matrice de stimulation

(B) Schéma de l'ensemble (stylet+piézoélectrique) constituant chacun des 24 stimulateurs.

(C) Fonction de transfert des stimulateurs piézoélectrique 2D pour une stimulation caractéristique. En haut, la commande en entrée ; au milieu, le déplacement du stimulateur mesuré avec un télémètre laser ; en bas le déplacement de la vibrisses mesuré de la même manière.

A l'aide de cette matrice, Jacob et al. ont montré que l'existence de propriétés d'intégration multi vibrissale d'ordre élevé, comme la capacité de détecter la direction d'un mouvement apparent, distinct de la direction de déflexion locale des vibrisses individuels (Figure I.15 : (Jacob, Estebanez et al. 2010)). De façon intéressante, cette sélectivité au mouvement apparent est également observée dans le noyau VPM du thalamus (Ego-Stengel, Le Cam et al. 2012), montrant l'existence d'intégration multi vibrissale d'ordre élevé également dans les structures sous-corticales.

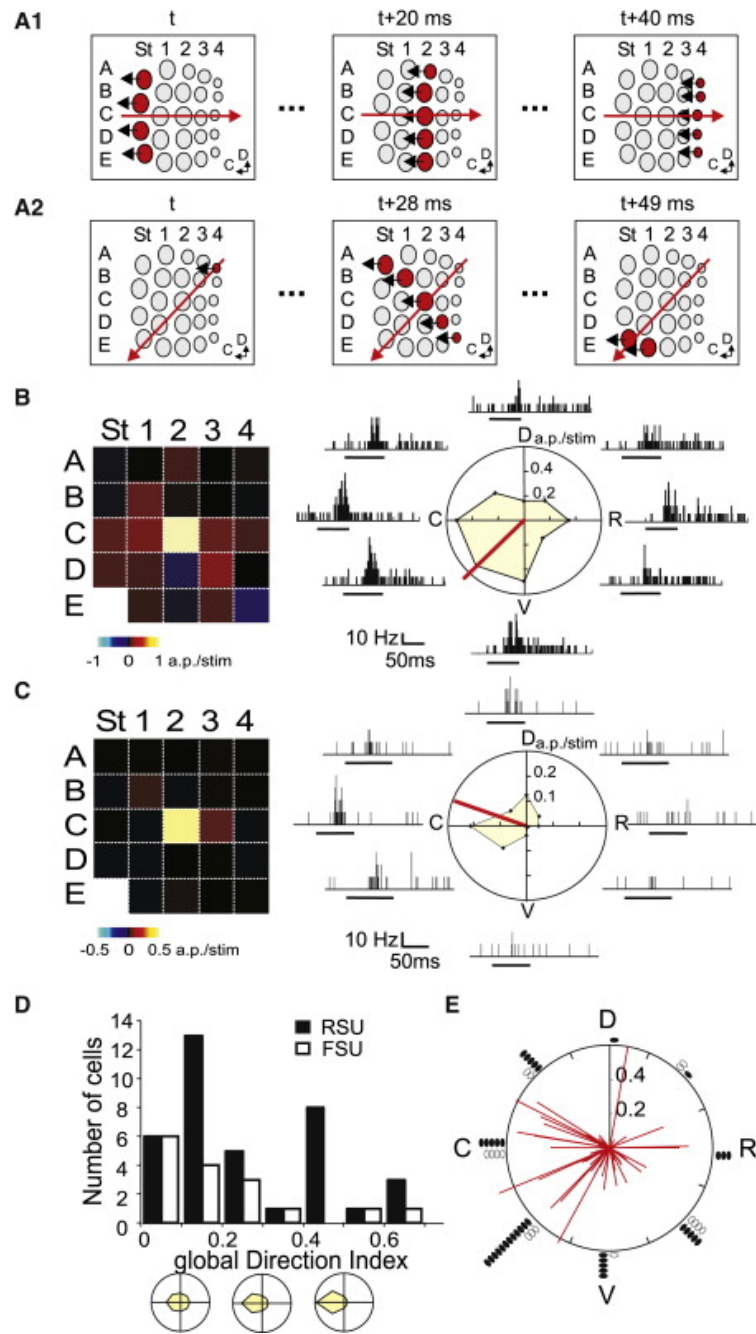


Figure 1.15 : Sélectivité de la réponse neuronale à la direction globale de stimulation (Jacob, Le Cam et al. 2008).

(A) Mouvement global de stimulation multi vibrissale pour deux directions sur huit étudiées.

(B) À gauche, champ récepteur multi vibrissal en couche V pour une cellule RSU (Regular Spiking Unit). À droite, représentation polaire des réponses aux huit directions globales. Le PSTH est représenté pour chaque direction et la direction préférée résultante est tracée en rouge.

(C) Idem que (B) pour une cellule FSU (Fast Spiking Unit).

(D) Distribution de population RSU (noir, $n = 37$) et FSU (blanc, $n = 16$) pour différents indices de direction globale.

(E) Distribution des vecteurs directions préférentielles globales pour chaque cellule.

I.2.6 Cellules simples et cellules complexes

Jusqu'à récemment, les études du cortex à tonneaux avaient utilisé des formes de stimulations simples correspondant à ce qu'il semblait être des stimulations élémentaires : rampes de vitesse constante, aller-retour rapide similaire à une fonction Dirac de stimulation. De plus, l'étude des corrélations entre les stimulations avaient été le plus souvent limitée à des interactions simples entre paires de vibrisses (cf. paragraphe précédent). Le groupe de Daniel Shulz a récemment modifié notre compréhension de ce système en utilisant d'une part une approche permettant de ne pas avoir *d'a priori* sur la forme des stimulations et en utilisant d'autre part un stimulateur multi vibrisse permettant de contrôler indépendamment l'ensemble des stimulations de toutes les vibrisses.

La première partie de ce travail a consisté à étudier les stimulations optimales dans le système des vibrisses (pour une seule vibrisse), sans *a priori*. En stimulant l'ensemble des vibrisses de manière non corrélée avec un bruit gaussien et en analysant *a posteriori* les composantes principales des stimulations ayant entraîné une réponse neuronale dans le cortex somato sensoriel (approche de corrélation inverse, « reverse correlation »), on peut établir une base des motifs de stimulations entraînant l'activité neuronale. Cette approche utilisée massivement dans le système visuel n'avait pas été appliquée jusque là dans le cortex à tonneaux. Elle permet de déterminer sans *a priori* la forme des stimuli permettant d'expliquer au mieux la décharge des neurones et ainsi réduire l'espace exploré.

Il ressort de ce travail que plus de 75% des réponses sont engendrées par des stimulations correspondant à une combinaison linéaire de seulement deux vecteurs V1 et V2 de cette base (Estebanez, Boustani et al. 2012). Il se trouve que V1 s'avère être la transformée de Hilbert de V2. Les filtres trouvés (Figure I.16) sont très différents des formes appliquées pour stimuler les vibrisses. Dans leur article, les auteurs interprètent néanmoins ces deux filtres en fonction des stimulations utilisées jusqu'ici. Le filtre 1 pourrait être considéré comme une rampe de vitesse et le filtre 2 comme une stimulation en position. D'un point de vue moins mathématique, les vecteurs V1 et V2 sont les formes des stimulations qui, appliquées aux vibrisses, élicitent la plus grande réponse des neurones et suffisent à expliquer l'ensemble de l'activité neuronale observée.

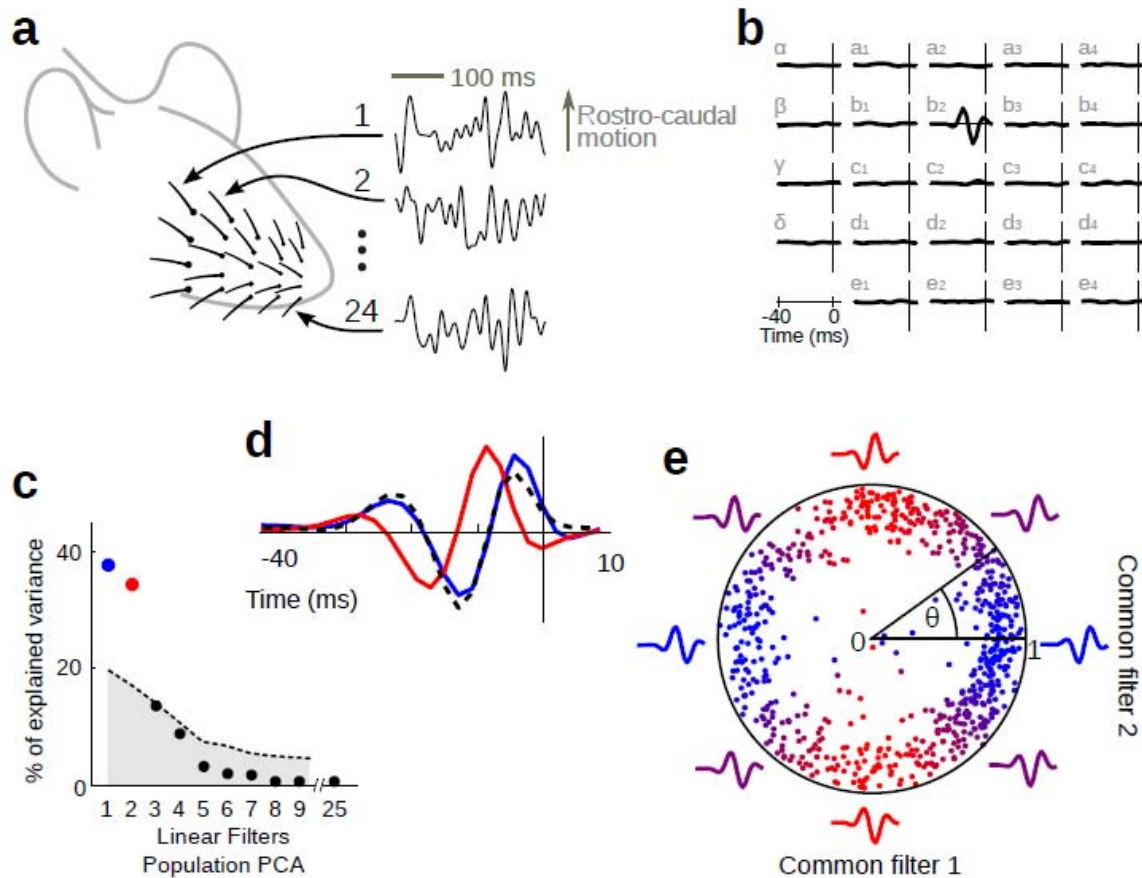


Figure I.16 : Espace des « phases » dans lequel sont encodées les stimulations vibrissales (Estebanez, Boustani et al. 2012).

(a) Un bruit Gaussien est appliqué de manière décorrélée suivant la direction rostro caudale aux 24 vibrisses situées à droite du museau.

(b) Exemple d'un filtre linéaire significatif montrant le déplacement temporel d'une vibrisse induisant une réponse sur un neurone monovibrissal obtenue en utilisant une analyse STC (spike triggered covariance).

(c) Analyse en composantes principales (PCA) appliqué à l'ensemble des filtres linéaires obtenus pour tous les neurones mono vibrissaux (680 filtres). Deux valeurs propres principales expliquent à elles seules 73% de la variance (points bleu et rouge).

(d) Les filtres propres (V1 et V2) correspondant aux deux valeurs propres principales. En pointillé la transformée de Hilbert de du filtre rouge.

(e) Représentation normalisée de tous les filtres significatifs de tous les neurones issus de l'ensemble des expériences, projetée sur le sous espace des stimulations défini par les filtres (V1, V2). La distance au centre donne la validité de la composition linéaire de chaque filtre dans la base (V1, V2).

En considérant ces deux vecteurs comme base de stimulation, l'enregistrement de l'activité neuronale fait apparaître une ségrégation entre deux sous-populations distinctes. Une distinction apparaît entre les cellules dites « simples » qui répondent pour un seul vecteur et les cellules « complexes » qui répondent pour la plupart à plusieurs combinaisons linéaires des deux vecteurs V1 et V2 (Figure I.17). Ainsi, pour une cellule « simple » la réponse pointe majoritairement vers une seule direction de l'espace des phases tandis que pour une cellule complexe la réponse présente plusieurs directions préférées. Pour une cellule complexe la réponse est symétrique : à chaque fois qu'un pic de réponse est obtenu dans une direction donnée, la réponse identique est obtenue dans la direction opposée.

L'autre intérêt de cette approche est de pouvoir étudier aussi de façon beaucoup plus systématique l'effet de corrélation entre les mouvements des vibrisses. Dans un premier temps, aucun délai n'est appliqué entre les stimulations et seul le degré de corrélation entre le mouvement (limité à la seule direction rostro-caudale dans cette étude) est étudié. En modulant le niveau de corrélation entre les stimulations des différentes vibrisses, une seconde ségrégation apparaît entre les neurones. Certaines cellules dites « locales » répondent aux stimulations de la vibrisse principale indépendamment du niveau de corrélation avec les stimulations des autres vibrisses tandis que d'autres cellules dites « globales » répondent uniquement quand le niveau de corrélation devient important (Figure I.18). Ainsi les cellules locales détectent les contrastes de stimulation entre les différentes vibrisses. **Ces résultats sont centraux dans notre étude et repris plus en détail dans la partie III.**

L'étude évoquée précédemment ayant été principalement menée sur des cellules des couches IV à VI et la couche II/III apparaissant comme un lieu important de l'intégration multi vibrissale, nous nous sommes employés à obtenir plus d'information sur la ségrégation des cellules dans cette couche, en particulier en ce qui concerne leur caractère global ou local (voir partie III).

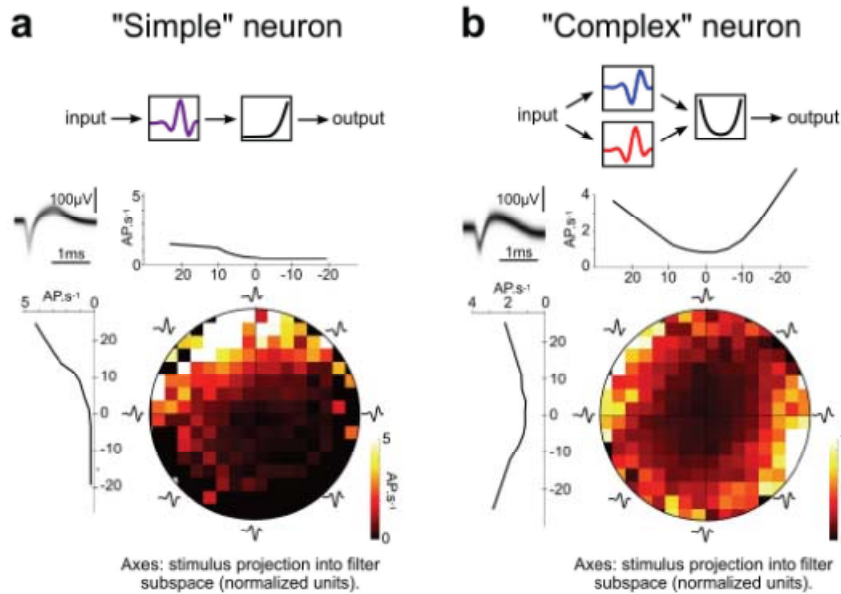


Figure I.17 : Définition des cellules simples et complexes (Estebanez, Boustani et al. 2012).

- (a) Caractéristique d'un neurone simple.
 (b) Caractéristique d'un neurone complexe.

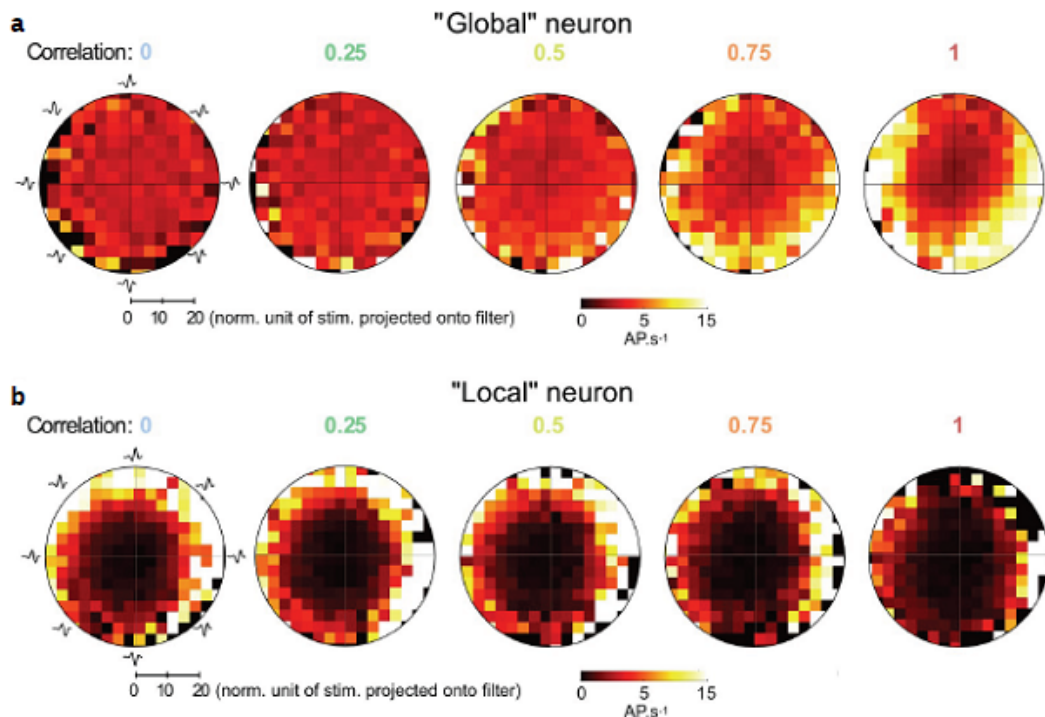


Figure I.18 : Définition des cellules locales et globales (Estebanez, Boustani et al. 2012).

- (a) Caractéristique d'un neurone global : son activité dépend du niveau de corrélation entre les stimulations multi vibrissales.
 (b) Caractéristique d'un neurone local : son activité ne dépend pas du niveau de corrélation entre les stimulations multi vibrissales.

Problématique sur l'intégration multi vibrissale

L'existence de cellules globales et locales n'a été démontrée que dans les couches granulaires et infra-granulaires du cortex à tonneau. L'absence de données sur ces propriétés en couches II/III provient essentiellement du fait que, compte tenu de sa faible profondeur, il est particulièrement difficile d'y effectuer des enregistrements électrophysiologiques de manière stable. Or la couche II/III du cortex somato sensoriel est un lieu important de l'intégration multi vibrissale, du fait de la divergence des afférences de la couche IV à cet endroit et des connections latérales à relativement longue portée entre colonnes qui y sont observées (Petersen and Sakmann 2001). Par conséquent le premier objectif de ma thèse sera d'étudier l'existence en couche II/III de cellules aux propriétés similaires de celles des cellules globales et locales des couches IV et V. Pour cela, j'utiliserai la microscopie à deux photons, dont la profondeur de pénétration est idéalement adaptée à l'enregistrement en couche II/III.

L'organisation du cortex en cartes fonctionnelles est un principe général de son organisation anatomo-fonctionnelle, observé pour toutes les modalités sensorielles notamment dans les cortex visuel (Ohki, Chung et al. 2005; Ohki, Chung et al. 2006; Ohki and Reid 2007) et auditif (Bandyopadhyay, Shamma et al. 2010; Rothschild, Nelken et al. 2010). La dimension spatiale de domaines homogènes de cellules partageant une même sélectivité pour un paramètre sensoriel est par exemple corrélée à l'amplitude de cette sélectivité (Nauhaus, Benucci et al. 2008). La microscopie à deux photons permet naturellement d'observer l'existence de cartographies fonctionnelles, qu'il est possible ensuite de positionner par rapport au repère anatomique des tonneaux. Par conséquent, je me poserai ensuite la question de l'organisation spatiale des cellules locales et globales en couche II/III et de leur lien avec l'organisation anatomique de S1bf.

L'existence d'une sélectivité nouvelle à la phase de la stimulation définie dans un espace 2D de filtres linéaires optimaux est un apport essentiel du travail d'Estebanez et al. Son lien précis avec la sélectivité à la direction de la déflexion d'une vibrisse, également représentée dans le cortex, est encore une question ouverte. L'une des questions importantes que je vais aborder dans ce travail, est l'étude des corrélations éventuelles entre les sélectivités à la phase et à la direction afin de mettre en évidence soit leur indépendance complète soit leurs liens éventuels. Pour cela, j'ai participé à la mise au point d'une version nouvelle du stimulateur multi-vibrisse inventé dans le laboratoire de Daniel Shulz et permettant de stimuler la direction de déflexion en 2D pour toutes les macro-vibrisses du rat simultanément.

Enfin, l'existence de cartographies fonctionnelles pour la sélectivité à la direction d'une seule vibrisse a été montrée en couche II/III (Andermann and Moore 2006; Kremer, Leger et al. 2011). Je me suis posé la question plus générale de l'existence et du positionnement relatif d'éventuels cartographies fonctionnelles associés à la direction et à la phase et à leur modulation par le niveau de corrélation entre vibrisses.

I.3. Microscopie à deux photons

L'activité neuronale peut être observée par différents moyens. Cependant l'étude qui nous concerne nécessite une technique permettant d'enregistrer une large population cellulaire avec une résolution spatiale (axiale et latérale) inférieure à la taille cellulaire (10 μm) et une résolution temporelle permettant de détecter des spikes individuels (quelques 10 ms pour un système avec une activité éparse). Le côté invasif de la technique choisie doit également être minimisé afin de ne pas altérer l'activité physiologique.

La pénétration d'électrodes directement dans le cerveau permet de mesurer la différence de potentiel électrique entre différents points et d'enregistrer très précisément des potentiels d'action (enregistrements intra ou extra cellulaires) ou même l'activité de canaux ioniques présents sur la membrane cellulaire (patch clamp). Ces enregistrements sont très résolus temporellement et spatialement, cependant en plus d'être particulièrement invasifs, ils ne permettent pas d'enregistrer une quantité suffisante de cellules pour étudier un phénomène à l'échelle du cerveau entier ou d'un réseau de neurones.

L'IRM permet quant à elle d'étudier des zones entières du cerveau de manière complètement non invasive. Cependant il faut noter qu'ainsi que l'imagerie intrinsèque, elle rend compte de la réponse hémodynamique et pas directement de l'activité neuronale. Trop peu résolue spatialement pour accéder à l'échelle cellulaire, cette technique n'est pas non plus suffisamment résolue temporellement (1 s) pour pouvoir détecter des spikes individuels. En plus d'être non invasifs, les EEG sont très bien résolus temporellement mais pas spatialement ce qui les rends inutilisables pour étudier un petit réseau de neurones

L'utilisation de VSD (Voltage Sensitive Dyes) permet d'enregistrer de larges zones du cortex avec une bonne résolution temporelle. Cependant, le fait qu'ils rendent compte du potentiel électrique de surface résultant d'un « moyennage » de l'activité électrique des couches inférieures, la résolution spatiale est assez médiocre (particulièrement du point de vue axial). Ce à quoi vient s'ajouter un effet de toxicité.

En utilisant des sondes calciques réagissant aux variations de calcium dans les milieux intra et extra cellulaires qui apparaissent lors des spikes, la microscopie de fluorescence à deux photons permet d'enregistrer de manière très résolue spatialement (<1 μm) l'activité neuronale d'une large population de neurones (plusieurs centaines de cellules). Cette technique peu invasive et suffisamment résolue temporellement (10 ms-100ms) pour pouvoir détecter des spikes individuels dans le système du cortex à tonneaux (celui-ci étant réputé peu « spikant ») est la méthode idéale pour adresser notre problématique.

I.3.1 Principe

Les principes théoriques de la microscopie à deux photons ont été publiés en 1931 par Göppert-Mayer (Göppert-Mayer 1931). Un fluorophore nécessitant l'apport énergétique d'un photon d'énergie $h\nu$ pour passer dans son état excité peut également effectuer cette transition avec une interaction à deux photons d'énergie $h\nu/2$ (Figure I.19) à condition que ceux-ci arrivent quasi simultanément, c'est-à-dire avec un écart temporel de l'ordre de la femto-seconde, sur le fluorophore. Cette interaction passe par un état virtuel énergétiquement intermédiaire entre l'état de base et l'état excité du fluorophore induit par l'absorption du premier photon. Si le second photon arrive durant la durée de vie de cet état virtuel, la transition finale vers l'état excité peut avoir lieu. Un tel phénomène nécessite donc une très forte intensité lumineuse et donc l'utilisation de lasers. Ainsi en 1990 l'arrivée des lasers pulsés permit à Denk de développer expérimentalement le premier microscope de fluorescence à deux photons.

Pourquoi utiliser deux photons quand un seul plus énergétique pourrait suffire à induire la transition électronique? Les fluorophores généralement utilisés nécessitent des apports énergétiques de l'ordre de $5 \cdot 10^{-19}$ J, soit l'énergie d'un photon de longueur d'onde de 400nm environ. Or à cause de la diffusion Rayleigh ($1/\lambda^4$) dans les milieux diffusants tels que les milieux biologiques, une telle source excitatrice envoyant des photons de 400nm aurait moins de chance d'atteindre les fluorophores en profondeur qu'une source à 800nm qui elle subirait beaucoup moins la diffusion du milieu traversé. L'utilisation de photons du proche infrarouge (environ 900nm) permet ainsi grâce à l'effet deux photons d'exciter des sondes fluorescentes en profondeur dans les tissus.

Permettant l'imagerie en profondeur, la microscopie de fluorescence à deux photons est donc un outil de choix pour enregistrer l'activité neuronale *in vivo* sous réserve d'utiliser des fluorophores rendant compte de cette activité (Lütcke and Helmchen 2011).

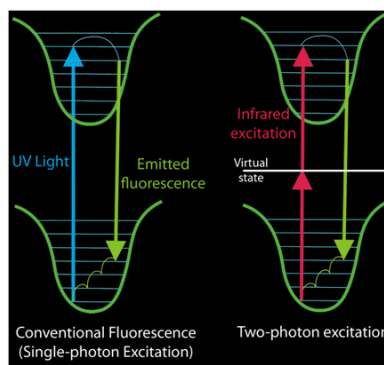


Figure I.19 : Principe de la microscopie à deux photons

I.3.2 Imagerie en profondeur

La microscopie de fluorescence à deux photons permet une imagerie bien plus profonde dans le tissu que la microscopie de fluorescence confocale. En effet, pour les raisons évoquées précédemment, la lumière excitatrice est bien moins diffusée dans le tissu en raison de sa grande longueur d'onde. Le libre parcours moyen (distance entre 2 évènements de diffusion) dans le cerveau du rongeur est ainsi de l'ordre de $200\mu\text{m}$ à 900nm , alors qu'il est plutôt de l'ordre de $50\mu\text{m}$ dans le visible (Helmchen and Denk 2005). Par ailleurs, du fait de l'effet non linéaire impliquant la nécessité de deux photons pour produire l'excitation, celle-ci a lieu uniquement dans le volume focal où le faisceau converge et où la densité de photons est suffisante (Figure I.20). Ainsi chaque photon de fluorescence émis provient du lieu très précis où a eu lieu l'excitation et ce indépendamment du chemin qu'il suit avant d'être collecté. Ainsi, à un instant t tous les photons émis collectés proviennent du même endroit. Il suffit donc de collecter un maximum de photons (Figure I.21) émis pour améliorer la qualité du signal ce qui confère à la microscopie de fluorescence à deux photons un meilleur rapport signal à bruit qu'en microscopie de fluorescence classique où une partie des photons collectés provient de point hors focus, contaminant ainsi le signal et qu'en microscopie confocale où le trou de détection ne permet de collecter que les photons balistiques provenant du foyer, et qui est donc bien moins lumineuse en profondeur que la microscopie à deux photons.

La microscopie de fluorescence à deux photons permet ainsi d'imager des tissus opaques jusqu'à des profondeurs de l'ordre de $500\mu\text{m}$ à 1 millimètre. La couche II/III du cortex à tonneaux se situant à environ $250\mu\text{m}$ sous la surface, nous pouvons donc imager de larges populations de neurones avec une excellente qualité de signal.

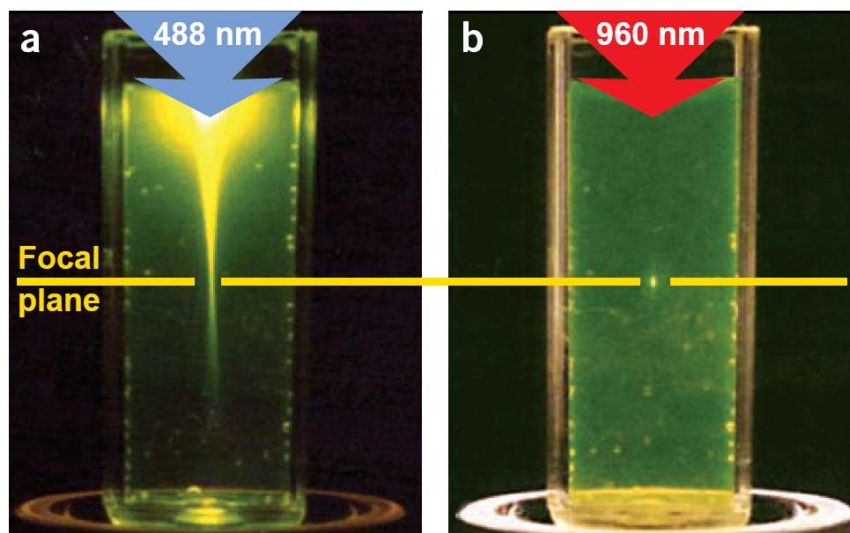


Figure I.20 : Localisation du lieu d'excitation en microscopie à deux photons dans un échantillon de fluorescéine (Zipfel, Williams et al. 2003).

(a) Excitation à un photon ($\lambda=488\text{nm}$, $NA=0.16$)

(b) Excitation à deux photons ($\lambda=960\text{nm}$, $NA=0.16$)

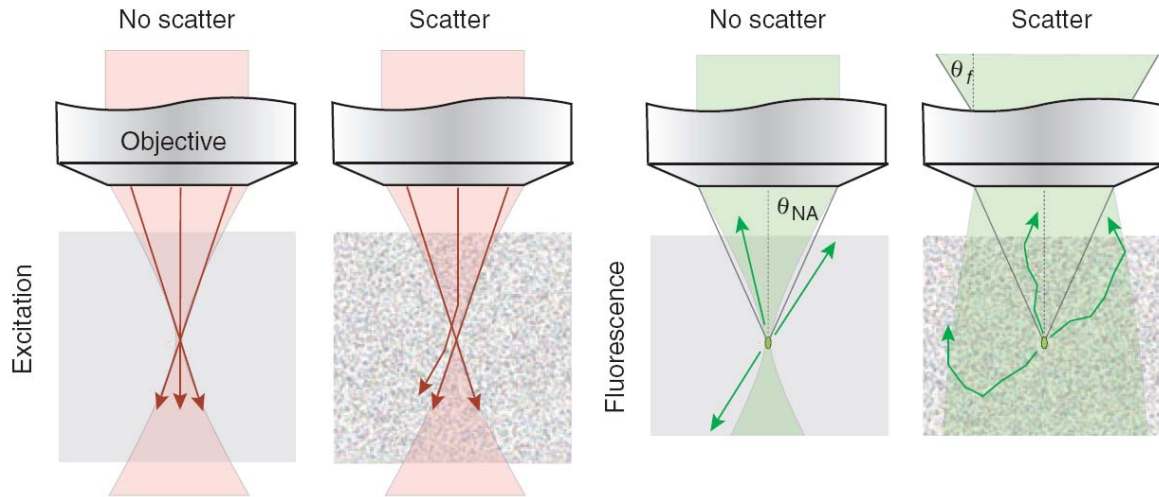


Figure I.21 : Effet du caractère transparent ou diffusant du milieu imagé sur la lumière excitatrice et la collection de fluorescence (Helmchen and Denk 2005).

Dans un milieu transparent la lumière excitatrice se focalise bien au foyer d'où provient directement la fluorescence émise qui est collectée dans le cône d'acceptance de l'objectif.

Dans un milieu diffusant, la diffusion entraîne la perte d'une partie de la lumière excitatrice qui ne passe pas par le foyer et la fluorescence émise semble provenir d'un champ large. Par rapport au milieu non dispersant, une fraction plus grande du signal est collectée.

I.3.3 Résolutions axiales et latérales

Pour imager des transitoires calciques sur des corps cellulaires, une résolution de l'ordre du μm serait suffisante, mais les caractéristiques de la microscopie de fluorescence à deux photons vont au-delà.

Donnée par la PSF (Point Spread Function), la résolution tant axiale que latérale dépend essentiellement de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé et de la couverture gaussienne de la pupille (Figure I.22 :(Timofeeva, Merette et al. 2003) ;Figure I.23 :(Helmchen and Denk 2005)). En ce qui concerne la résolution latérale théorique (mesurée à $1/e$) pour une ouverture numérique inférieure ou égale à 0,7 :

$$\omega_{xy} = 0.320 * \frac{\lambda}{\sqrt{\text{NA}}} \quad (\text{Eq. I.2})$$

Pour une ouverture numérique supérieure à 0,7 :

$$\omega_{xy} = 0.325 * \frac{\lambda}{\sqrt{2 * \text{NA}^{0.91}}} \quad (\text{Eq.I.3})$$

Enfin la résolution axiale théorique est donnée par :

$$\omega_z = 0.532 * \frac{\lambda}{\sqrt{2}} * \left(\frac{1}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \right) \quad (\text{Eq. I.4})$$

avec n l'indice de réfraction du liquide d'immersion.

A partir de ces valeurs, la FWHM est obtenue par multiplication par le facteur $2\sqrt{\ln 2}$.

Par ailleurs, la résolution n'est pas affectée par la diffusion dans l'échantillon (de Grauw, Vroom et al. 1999; Dong, Koenig et al. 2003).

Ainsi, à 900 nm et avec un objectif à eau d'ouverture numérique de 0,95 on peut espérer les résolutions suivantes :

$$\omega_{xy} = 0.320 * \frac{\lambda}{\sqrt{NA}} = 209 \text{ nm}$$

$$\omega_z = 0.532 * \frac{\lambda}{\sqrt{2}} * \left(\frac{1}{n - \sqrt{(n^2 - NA^2)}} \right) = 848 \text{ nm}$$

Les calculs de résolutions pour notre microscope en tenant compte de la couverture de la pupille arrière de l'objectif sont explicités en partie II.

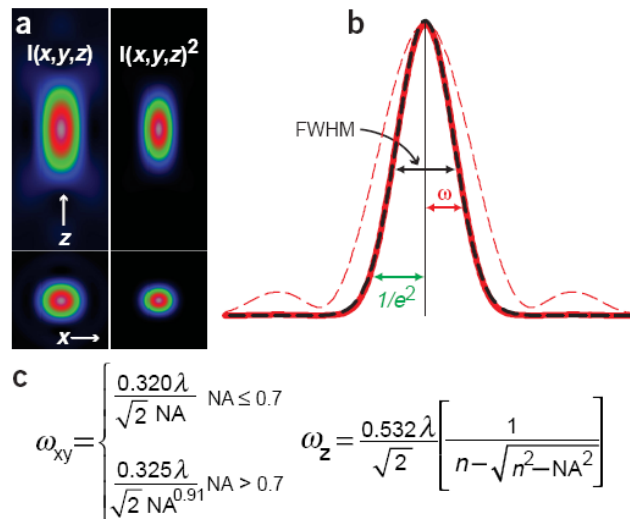


Figure 1.22 : Volume d'excitation et résolution en microscopie à deux photons (Zipfel, Williams et al. 2003)

(a) Vues axiales et latérales des PSF pour l'intensité et son carré.

(b) Profil axial $(0, 0, z)$ de la PSF pour l'intensité I (courbe pointillée rouge), l'intensité au carré I^2 (courbe rouge).

(c) Equations donnant les largeurs à $1/e$ axiales (ω_z) et latérales (ω_{xy}) pour I^2 soit la résolution théorique du microscope en fonction de l'ouverture numérique NA de l'objectif et de l'indice du n du milieu

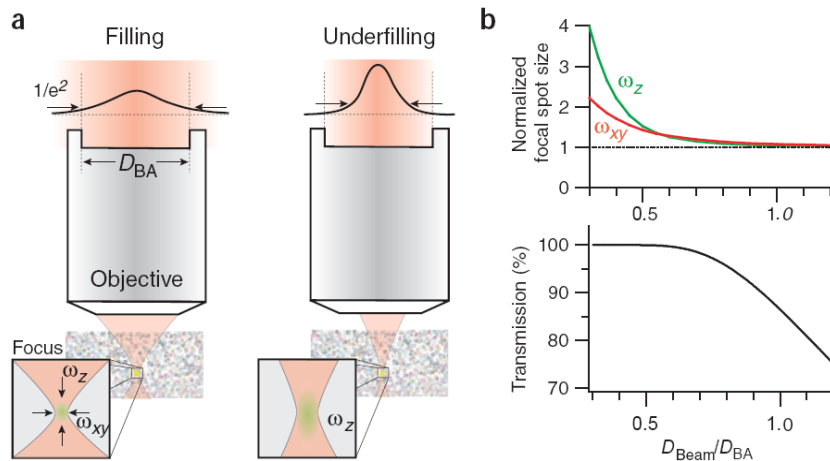


Figure 1.23 : Ajustement de la couverture par le faisceau de la pupille arrière de l'objectif (Helmchen and Denk 2005)

(a) Une couverture parfaite à $1/e^2$ (taux de remplissage de 1) de la pupille maximise la résolution car toute l'ouverture numérique est utilisée tandis qu'une « sous-couverture » de la pupille (taux de remplissage de 0.7) maximise la puissance transmise en réduisant légèrement la résolution.

(b) Taille du volume focal et puissance transmise en fonction du rapport entre la taille du faisceau laser à $1/e^2$ (D_{beam}) et la taille de la pupille arrière de l'objectif (D_{BA}).

1.3.4 Propriétés des sondes calciques

Le signal de fluorescence collecté en microscopie à deux photons et rendant compte de l'activité étudiée provient de fluorophores appelés aussi « sondes » qui sont soit endogènes dans le cas de mutants soit injectés directement dans la zone étudiée. Concernant le rat, il n'existe pas à l'heure actuelle de mutant présentant des indicateurs calciques fluorescents transgéniques, les sondes calciques sont donc injectées avant l'imagerie (O'Donovan, Ho et al. 1993; Svoboda, Denk et al. 1997; Stosiek, Garaschuk et al. 2003; Helmchen and Nevian 2007; Nagayama, Zeng et al. 2007).

Pour être utilisable *in vivo*, un fluorophore doit remplir plusieurs conditions, à savoir :

- rendre compte de l'effet biologique à observer.
- être biocompatible et induire le minimum de toxicité pour les cellules.
- avoir une différence de fluorescence entre le niveau de base et le niveau excité suffisante pour être détectable.
- avoir une constante de temps raisonnable pour bien rendre compte de la dynamique de l'activité.
- Etre peu sensible au photo blanchiment

Le milieu extracellulaire présente une concentration en ions calcium Ca^{2+} d'environ $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,5\text{mM}$ (Sanchez-Vives and McCormick 2000) tandis qu'à l'intérieur du cytoplasme, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de l'ordre de 100nM au repos (notons que cette valeur varie selon les compartiments). Lors d'un potentiel d'action, la dépolarisation de la membrane entraîne l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel (Chin 1998; Weiss and Burgoyne 2002) qui laisse rentrer le calcium. La détection des potentiels d'action par imagerie calcique repose sur la mesure de ces augmentations transitoires de la concentration de calcium intracellulaire. Pour ce faire, nous utilisons des sondes fluorescentes dont l'intensité varie avec la concentration de calcium.



Avec $[\text{S}]$, $[\text{Ca}^{2+}]$ et $[\text{SCa}]$ les concentrations en sonde, en calcium libre et en complexe.

Compte tenu des propriétés de notre montage, il faut être capable de mesurer des variations de fluorescence supérieures au bruit et donc choisir une sonde dont la variation de fluorescence sera suffisante compte tenu de son K_d et des variations de concentration de $[\text{Ca}^{2+}]$ mises en jeu lors d'un potentiel d'action. A K_d fixée, on évalue la variation de $[\text{Ca}^{2+}]$ mesurable entre 0.1 et 10 fois K_d . En tenant compte de toutes les propriétés évoquées, pour étudier l'activité calcique évoqué par des potentiels d'action dans des populations neuronales, la sonde calcique la plus utilisée est Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM (OGB1, Figure I.24) (Stosiek, Garaschuk et al. 2003; Kerr, Greenberg et al. 2005). Présentant des variations de fluorescence de l'ordre de 10% pour un potentiel d'action, avec une constante de temps de décroissance du transitoire de quelques centaines de millisecondes et un $K_d = 170\text{nM}$ ces sondes sont parfaitement indiquées pour la mesure de l'activité dans S1bf.

Ces sondes sont dites AM (Acétoxy-Méthyl) c'est-à-dire qu'elles présentent des groupes carboxyles qui sont estérifiés et ainsi rendues non polaires afin de mieux pénétrer les membranes plasmiques. Sous la forme AM, elles sont insensibles au calcium mais une fois dans les cellules, les groupes ester sont hydrolysés par des estérases cellulaires, les sondes sont ainsi rendues sensibles au calcium et piégées dans les cellules.

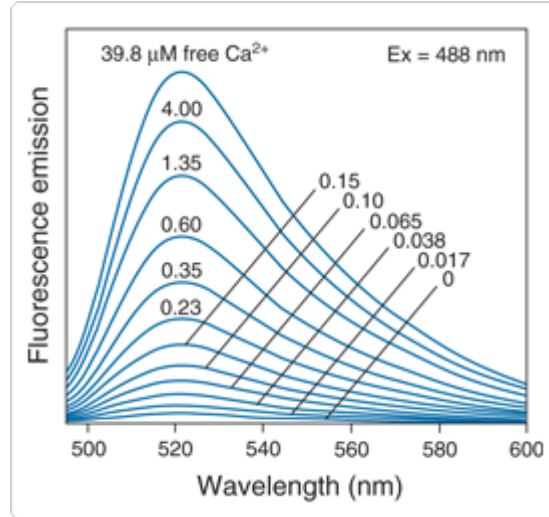


Figure 1.24. Spectre d'émission des sondes Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM en fonction de $[Ca^{2+}]$

I.3.5 Signaux acquis - Transitoires calciques

La mesure des transitoires calciques évoqués par des potentiels d'action au soma des neurones permet d'étudier l'activité neuronale (Helmchen and Tank 2011). Lors d'un potentiel d'action, l'entrée quasi-instantanée de calcium au niveau du soma du neurone via des canaux calciques voltage dépendant entraîne une augmentation rapide de la concentration de calcium intracellulaire et donc de la fluorescence, suivie d'une décroissance lente, liée à l'extrusion à un taux γ du calcium. La variation de fluorescence associée à un potentiel d'action unique correspond à un transitoire calcique individuel dont la forme a été décrite en détail (Lütcke and Helmchen 2011). Lors d'un train de potentiels d'action, la trace de fluorescence est la convolution du train de potentiels d'action par la forme de ce transitoire calcique, avec du bruit additionnel. Pour de petites augmentations de concentration en calcium, loin de la saturation de la sonde fluorescente, le transitoire a une amplitude $\Delta F/F$ et un temps de décroissance τ donné par :

$$\Delta[Ca] \propto \Delta F/F \propto \frac{1}{(1 + \kappa_S + \kappa_B)} \quad (\text{Eq. I.6})$$

$$\tau = \frac{(1 + \kappa_S + \kappa_B)}{\gamma} \quad (\text{Eq. I.7})$$

$$\kappa_S = \frac{\partial[SCa]}{\partial[Ca]} \text{ est la constante de liaison de la sonde S avec le calcium et } \kappa_B = \frac{\partial[B\text{Ca}]}{\partial[Ca]}$$

est la constante de liaison du tampon endogène B avec le calcium.

En premier lieu, l'amplitude du transitoire calcique dépend donc de la quantité de calcium entrant par potentiel d'action, qui est déterminée par l'expression des canaux calciques et la durée du potentiel d'action, tandis que la durée du transitoire dépend du

taux d'extrusion du calcium. Ces deux paramètres dépendent aussi de l'indicateur calcique qui agit comme un tampon supplémentaire du calcium. Par conséquent les transitoires calciques sont réduits et prolongés lorsque la concentration en sondes est augmentée. Il est à noter qu'il peut y avoir perturbation de l'homéostasie calcique: la sonde agissant comme un tampon calcique, elle peut modifier la dynamique cellulaire lors d'une entrée de calcium.

Une fois les sondes injectées (Figure I.25), en mesurant la variation de fluorescence des cellules marquées sur le champ imagé lors de la stimulation, on peut ainsi accéder précisément à leur activité neuronale (Figure I.26) en déconvoluant la trace calcique par la forme typique d'un transitoire, si le rapport signal sur bruit est suffisant. Un enregistrement synchronisé des transitoires calciques et des potentiels d'action à l'aide d'une pipette permet de calibrer la forme et l'amplitude des transitoires selon le nombre de potentiels d'action les ayant évoqués (Figure I.27 : (Kerr, Greenberg et al. 2005)).

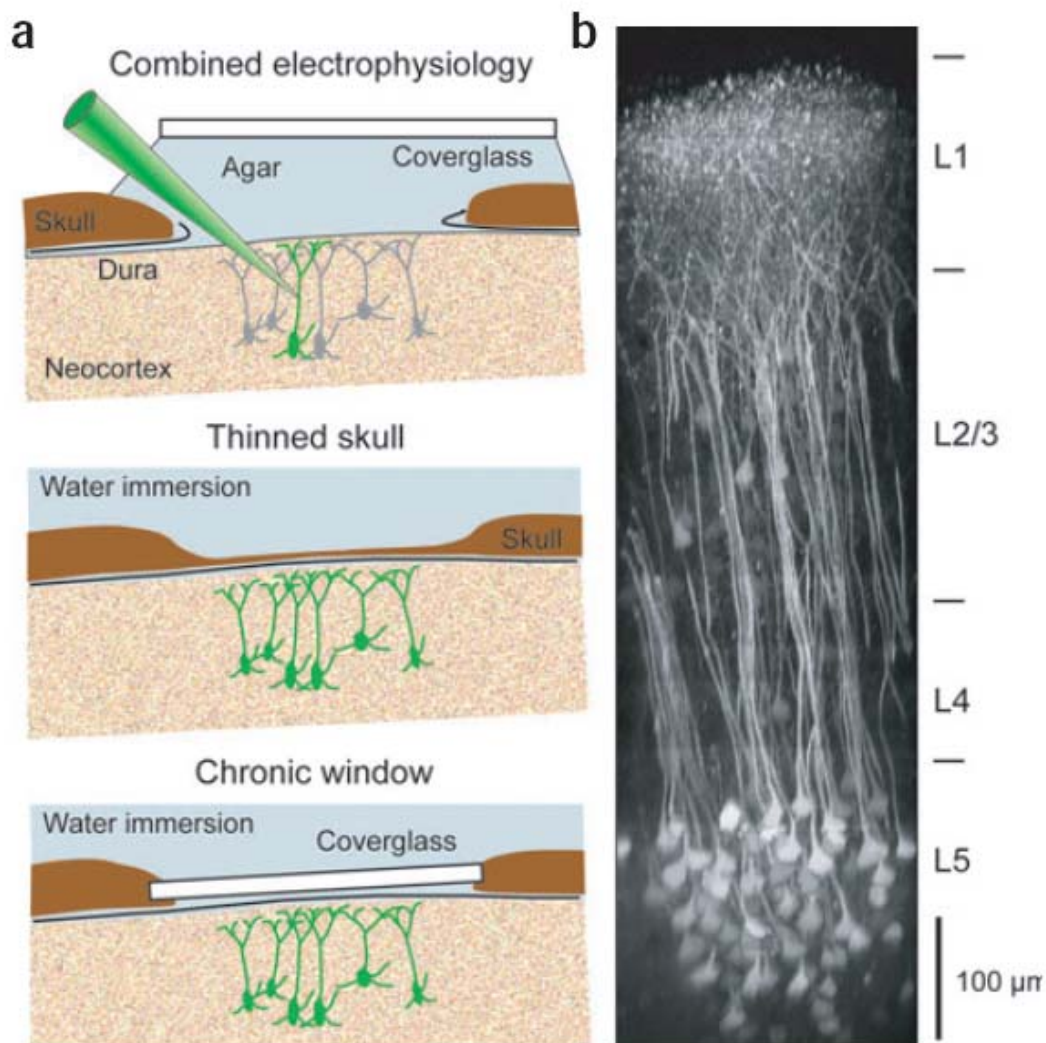


Figure I.25 : Imagerie à deux photons *in vivo* du néocortex (Helmchen and Denk 2005)
 (a) Trois différents types d'accès au cortex. En haut, craniotomie avec ablation de la dure-mère pour permettre l'injection des sondes fluorescentes ; une pression est maintenue sur le cortex par un gel d'agarose et une lamelle de verre. Au milieu, imagerie à travers le crâne aminci. Cette technique ne permettant aucun marquage, elle ne peut être utilisée qu'avec des animaux transgéniques exprimant des protéines fluorescentes. En bas, Implant chronique d'une fenêtre (lamelle de verre) fixée directement sur le crâne.
 (b) Exemple d'imagerie à deux photons sur l'ensemble d'une colonne corticale dans le néocortex.

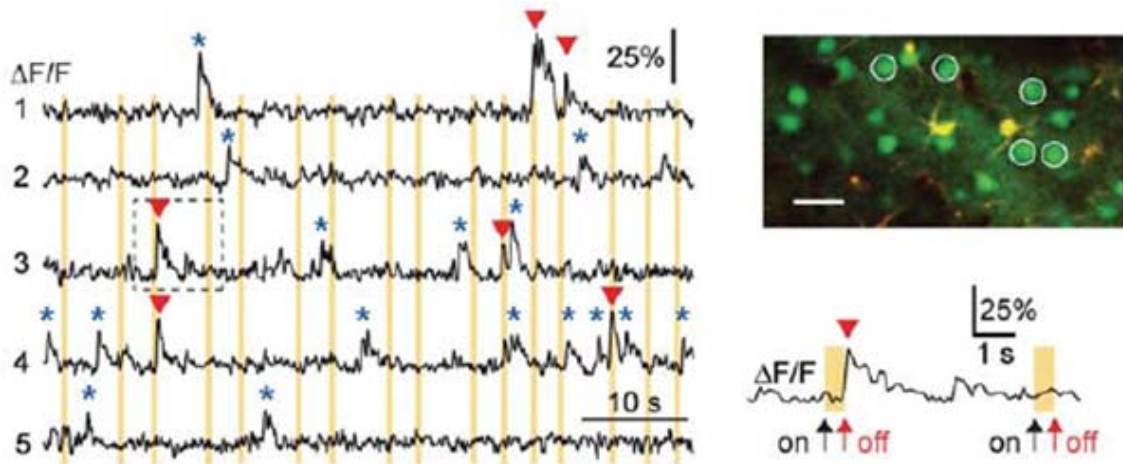


Figure I.26 : Mesure de transitoires calciques en couche II/III du cortex à tonneaux chez le rat (Kerr, de Kock et al. 2007)

A gauche, les traces calciques induites par stimulation vibrissale pour les neurones représentés sur l'image à droite (barre d'échelle : 30 μm). Les astérisques bleues indiquent les transitoires spontanés tandis que les flèches rouge indiquent les transitoires induits par les stimulations

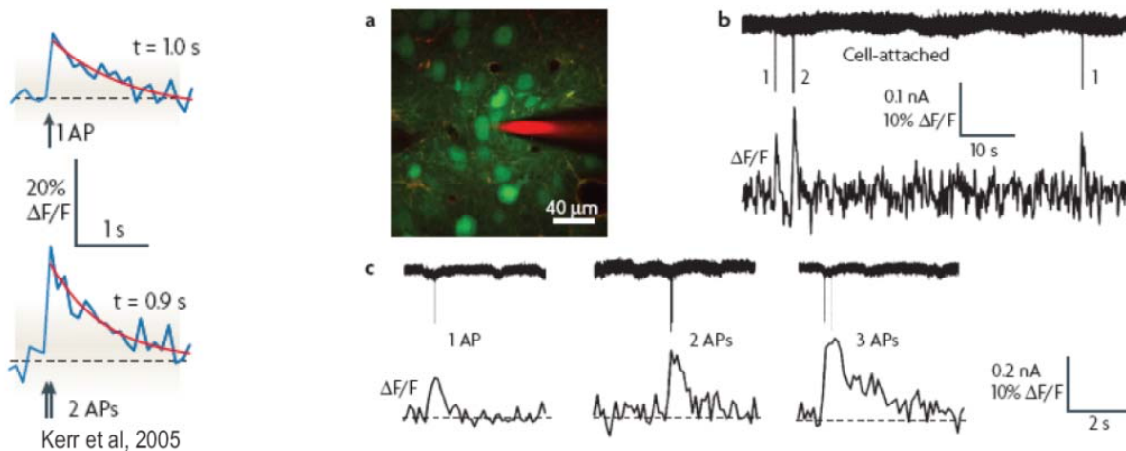


Figure I.27 : Enregistrements simultanés des transitoires calciques et des signaux électrophysiologiques correspondant (Kerr, Greenberg et al. 2005)

(a) Image en microscopie à deux photons du neurone enregistré (marquage OGB1). La pipette d'enregistrement chargée en Alexa fluor apparait en rouge.

(b) Enregistrements synchronisés du signal électrophysiologique extra cellulaire (en haut) et du signal de fluorescence (en bas)

(c) Comparaison entre les formes et les amplitudes des traces calciques générées par respectivement 1, 2 ou 3 potentiels d'action.

Problématique sur la microscopie à deux photons *in vivo*

L'enregistrement de transitoires calciques générés par des potentiels sur de larges populations neuronales (plusieurs dizaines, voir des centaines de cellules), avec une bonne résolution temporelle (quelques dizaines de ms), *in vivo*, avec un rapport signal sur bruit permettant d'identifier les transitoires dus à un potentiel d'action unique et sur des temps longs, reste un problème difficile. J'ai essayé de développer une approche originale par rapport aux solutions existantes dans la plupart des laboratoires pour aborder cette question.

Je me suis posé la question de savoir comment optimiser le rapport entre lumière collectée (pour maximiser le rapport signal sur bruit) tout en minimisant la puissance incidente pour éviter les problèmes de photo-blanchiment et de photo-toxicité. Pour résoudre ce problème, il était important que la solution trouvée permette d'obtenir une meilleure résolution temporelle que celle fournie par les galvanomètres classiques, et fonctionne toujours dans un mode d'images, pour pouvoir utiliser des algorithmes de corrections des artéfacts de mouvements.

La solution que j'ai choisie de mettre en œuvre pour répondre à cette question repose sur : 1) l'utilisation de scanners résonnants, afin de limiter le photo-blanchiment grâce à un temps passé par pixel faible et d'optimiser la cadence des images (jusqu'à 100Hz) ; 2) une détection en comptage de photons avec des tubes photomultiplicateurs basés sur une photocathode GaAsP semi-conductrice. L'intérêt de cette détection est d'optimiser la quantité de photons collectés grâce à leur exceptionnelle efficacité quantique et de bénéficier du bruit minimal d'une acquisition en comptage de photons. Compte tenu des flux de photons élevés auxquels ces expériences sont en fait menées pour détecter des petites variations de fluorescence, ce travail m'a conduit à analyser et à optimiser le comptage de photons dans un régime de haut flux de photons, qui n'est pas son régime habituel d'utilisation et qui soulève un certain nombre de difficultés. Enfin la combinaison unique du balayage avec des scanners résonnants et de la technique de comptage de photons a soulevé des difficultés en terme d'acquisition du signal.

Pour caractériser cette nouvelle solution d'imagerie, je chercherai à analyser quantitativement les bruits sur les traces de fluorescence mesurées *in vivo* afin d'identifier et d'essayer d'exclure tous les bruits expérimentaux. En ce qui concerne les bruits liés aux artéfacts de mouvements, je chercherai à mettre au point un système de stabilisation a posteriori des images, l'objectif final étant d'obtenir *in vivo* des enregistrements uniquement limités par le bruit de photons.

Problématique générale

Dans mon travail de thèse, j'aborderai donc les questions suivantes dans la partie 3 :

- Existe-t-il en couches II/III des cellules globales et locales ?
- Quelle est l'organisation fonctionnelle de ces cellules en couche II/III et le lien de cette organisation avec l'anatomie des tonneaux ?
- Quel est le lien entre la sélectivité à la phase dans l'espace des filtres linéaires optimaux et à la direction de déflexion en 2D d'une vibrisse ?
- Comment s'organisent spatialement ces différentes sélectivités ?

Afin d'adresser ces questions, j'ai cherché à développer un montage de microscopie à deux photons original capable d'enregistrer l'activité neuronale en couche II/III du cortex tout en donnant accès à l'architecture des réseaux enregistrés. J'adresserai donc les questions suivantes dans la prochaine partie :

- Comment construire un microscope combinant à la fois une capacité de détection à haute cadence des signaux calciques individuels et ne nécessitant qu'une puissance modérée de laser d'excitation pour limiter la photo toxicité et le photo blanchiment ?
- Comment peut-on quantitativement identifier les différentes sources de bruits lors des enregistrements *in vivo*, et quelles solutions peut-on mettre en œuvre pour réduire ces bruits au minimum pour n'être plus limité que par le bruit de photon ?
- Comment estimer la qualité des enregistrements des cellules individuelles ? En particulier, comment exclure le risque de contamination par des signaux collectifs comme ceux provenant du neuropil et qui pourraient faire émerger des composantes communes « fantômes » de l'activité des neurones et les corréler faussement entre eux ?

II. Enregistrement de l'activité neuronale en microscopie à deux photons

II.1. Introduction

La microscopie de fluorescence à deux photons permet d'obtenir des images de fluorescence en profondeur dans les tissus diffusants, offrant ainsi la possibilité d'enregistrer l'activité neuronale d'une large population de neurones tant chez l'animal anesthésié que chez l'animal éveillé (tête fixée) (Dombeck, Khabbaz et al. 2007; Sawinski, Wallace et al. 2009; Margolis, Lutcke et al. 2012). De tels enregistrements nécessitent l'imagerie de grands champs (au moins 150 μ m) pour pouvoir observer plusieurs dizaines de neurones simultanément. Idéalement, il serait même intéressant de mesurer l'activité neuronale sur des champs de plusieurs centaines de microns, couvrant par exemple l'ensemble d'un tonneau. Ces enregistrements doivent être également obtenus avec une bonne résolution temporelle pour détecter les événements rapides tels que les transitoires calciques évoqués par les potentiels d'action (cf. partie I). Sachant que les temps de montées des transitoires calciques au soma sont de l'ordre de 10 à 50 ms au maximum, une cadence d'images d'au moins 20Hz, voire idéalement de 100Hz est nécessaire. En outre, les transitoires calciques évoqués par des potentiels d'action correspondent à des variations relatives de la fluorescence de l'ordre de 10% par potentiel d'action avec les marqueurs calciques classiques, OGB1-AM, GCAMP3,... (cf. partie I). Ces petites variations de fluorescence sont en pratique difficiles à détecter du fait du bruit expérimental qui est au moins égal au bruit de photons. Or en proportion, le bruit de photons est d'autant plus grand que (i) la fréquence d'imagerie est élevée et (ii), dans le cas d'une imagerie à balayage, le champ observé est grand, car le nombre de photons comptés par soma est plus faible. Enfin, les artefacts de mouvement dus aux mouvements physiologiques de l'animal (respiration, rythme cardiaque...) induisent des problèmes supplémentaires pour obtenir de bons enregistrements. Le faible rapport signal sur bruit des signaux, leur dynamique rapide, la nécessité d'observer des grands champs et les artefacts dus au mouvement de l'animal posent donc des problèmes importants. Ce type d'enregistrements *in vivo* en neurobiologie reste donc difficile à effectuer. Pour tenter de les rendre plus accessibles, nous proposons ici principalement deux améliorations. La première porte sur la stratégie de balayage de l'échantillon et la seconde sur la méthode de collection des photons de fluorescence.

L'utilisation traditionnelle de miroirs galvanométriques (fréquence maximale de l'ordre de 1 kHz par ligne) pour scanner l'échantillon limite la fréquence d'acquisition des images à environ 1-10 Hz, en particulier si l'on veut scanner des champs larges avec suffisamment de lignes. D'autre part la fréquence des images est également dépendante de la taille du champ imagé (Tan, Llano et al. 1999). Ceci soulève au moins trois difficultés. (i) Les transitoires calciques, qui ont un temps de montée plus rapide que la cadence des images, sont mal échantillonnés, ce qui se traduit par une diminution effective du signal mesuré, donc une diminution du rapport signal sur bruit (Kerr and Denk 2008); (ii) les instants où se produisent les transitoires calciques sont connus avec une très faible précision, ce qui est une limitation quand on s'intéresse au timing précis

des potentiels d'action et pas seulement au nombre de potentiels d'action émis ; (iii) les mouvements artéfactuels physiologiques dus en particulier à la respiration, aux battements cardiaques et éventuellement à des mouvements musculaires, en particulier dans les enregistrements sur animal éveillé, ont des composantes fréquentielles à plusieurs Hz et seront donc à nouveau mal échantillonnés par les images, donc difficiles à corriger. Par conséquent l'usage de galvanomètres pour l'imagerie *in vivo* n'est pas totalement satisfaisante et se limite souvent à des champs relativement petits (100 à 150 μ m) pour pouvoir les échantillonner rapidement (au maximum 20Hz) (Fan, Fujisaki et al. 1999; Nguyen, Callamaras et al. 2001).

Une solution possible pour augmenter la résolution temporelle consiste à effectuer des balayages limités à une seule ligne ('line scan') (Kurtz, Fricke et al. 2006) mais cette solution se fait au détriment de l'information spatiale. Un système multi focal permet également un scan rapide des images mais la nécessité d'utiliser un capteur d'image limite considérablement la profondeur de pénétration de cette technique (Kim, Buehler et al. 2007). La technique de balayage point par point à l'aide de scanners galvanométriques et surtout de déflecteurs acousto-optiques permet d'effectuer des enregistrements très rapides (0,1 à 1 kHz) avec un rapport signal à bruit élevé (Reddy and Saggau 2005; Salome, Kremer et al. 2006; Gobel and Helmchen 2007). Cependant les artefacts de mouvement deviennent problématiques avec cette approche dès lors que leur mesure et leur correction ne peuvent être effectuées en l'absence d'images : dans un enregistrement point par point, il n'est pas possible de discriminer une variation physiologique du signal d'une variation due à des mouvements.

En conséquence, désirant enregistrer l'activité de larges populations neuronales, en profondeur dans le cortex, avec une bonne résolution temporelle et un bon rapport signal à bruit, j'ai choisi de ne pas utiliser une approche de balayage point par point, mais de me baser sur l'acquisition d'images permettant ainsi de (i) corriger les mouvements dans le plan et de (ii) détecter les éventuels mouvements axiaux (en dehors du plan)(Reddy and Saggau 2005; Gobel, Kampa et al. 2007). Pour optimiser la vitesse de balayage de l'imagerie à deux photons, j'ai utilisé un montage basé sur un galvanomètre résonnant pour un axe de balayage (fréquence de 8kHz pour 1 ligne), ce qui permet de réaliser des balayages grands champs (100 à 600 μ m) à des cadences de 10 à 100kHz et avec un nombre de lignes par images suffisant pour bien résoudre les corps cellulaires. Je montrerai dans la suite que cette vitesse de balayage élevée permet en particulier un bon échantillonnage des transitoires calciques et la détection efficace des artefacts de mouvements. Pour ce dernier point, je montrerai en particulier la mise au point d'un système efficace de suivi des mouvements en 3D fonctionnant à une cadence de 10Hz, donc permettant de corriger les artefacts de mouvements dus à la respiration et au battement cardiaque. Enfin, nous montrerons les avantages de ce balayage en termes de photo-blanchiment, car il a été observé dans la littérature qu'il était en pratique plus avantageux pour le limiter de balayer rapidement l'échantillon pour un même temps total d'intégration (X. Chen et al., 2011 ; Zipfel et al., 2003).

Le second apport de mon travail porte sur la détection des photons de fluorescence. Pour maximiser le rapport signal à bruit, je me suis orienté vers une approche en comptage de photons. Par rapport au mode analogique, cette technique permet de minimiser le bruit de détection à faible flux de photons. En effet, théoriquement, en comptage de photons, le seul bruit présent est le bruit de photons dû à la distribution Poissonnienne des photons dans la lumière. Ce bruit (déviations standard) varie comme la racine carrée du nombre de photons comptés. En revanche, une mesure analogique est sensible à la variation du gain du photomultiplicateur (PMT), aux bruits à basse fréquence, à la variation de la réponse à un photon unique, à la difficulté d'intégrer correctement le signal (Driscoll, Shih et al. 2011)... En conséquence, le bruit mesuré est toujours supérieur à celui obtenu avec le même détecteur utilisé en comptage de photons, d'environ 20 à 70% (Driscoll, Shih et al. 2011). Cependant l'avantage du comptage de photons par rapport au mode analogique disparaît à haut flux de photons, car la mesure en comptage de photons devient alors sous-linéaire à cause de l'électronique qui impose un intervalle minimum de temps séparant deux impulsions de détection. En effet, après l'arrivée d'un premier photon le détecteur observe une période durant laquelle il est incapable de détecter l'arrivée d'un second photon. Cette période est appelée PPR (Pair Pulse Resolution) et vaut de quelques ns à quelques dizaines de ns en fonction des PMT. Cette limitation correspond à un bruit additionnel qui est observé à des flux de photons supérieurs à $1/PPR$ et qui limite alors l'utilisation du comptage de photons à haut flux, en comparaison des détecteurs analogiques.

Pour savoir si l'utilisation d'une électronique en comptage de photons est avantageuse, il est donc nécessaire d'avoir une idée du flux de photons de fluorescence dans l'expérience. Ce flux est en général limité (sauf à très grande profondeur) par les photo-damages et le photo-blanchiment. Il est difficile en général d'obtenir une estimation précise de cette quantité dans la littérature, car les détecteurs sont presque toujours utilisés en analogique et toutes les informations nécessaires pour convertir les niveaux de gris des images en flux de photons ne sont pas connues (gain et efficacité du PMT etc.). Dans les expériences que nous menons au laboratoire, les flux de photons sont en général toujours dans la gamme où la réponse de notre détecteur commence à être non-linéaire (soit de l'ordre de quelques MHz à quelques dizaines de MHz). Nous montrerons que si l'on éclairait l'échantillon avec moins d'intensité, le bruit de photons serait rédhibitoire pour détecter des transitoires calciques évoqués par des potentiels d'action individuels. Par ailleurs, un flux plus grand augmenterait le photo-blanchiment et limiterait le temps d'enregistrement, alors que nous avons besoin de mesurer l'activité dans un même champ optique pendant une heure environ (voir plus loin).

Par conséquent, il est important d'étudier comment il est possible d'implémenter au mieux une électronique en comptage de photons dans un régime proche de la non-linéarité des PMT afin de tirer avantage de cette méthode de mesure du flux lumineux. Nous avons en particulier le projet d'utiliser les nouveaux PMT semi-conducteurs de la société Hamamatsu (H7421) dont l'efficacité quantique exceptionnelle (près de 50%, y compris dans le rouge) surpasse largement celle de tous les autres PMT. Nous montrerons

que, pour profiter pleinement du bruit minimal du comptage de photons, nous avons (i) fait modifier l'électronique des PMT pour en diminuer la PPR de 70ns à 20ns et (ii) implémenté un système de deux puis quatre détecteurs PMT. Ainsi, notre montage permet d'utiliser ces détecteurs jusqu'au flux continu maximal qu'ils tolèrent et ce dans un régime quasi linéaire. Nous montrerons aussi comment ce type de PMT en comptage de photons de grande efficacité quantique mais de faible dimension et ouverture numérique ont pu être optiquement intégrés dans un montage de microscopie à deux photons nécessitant de capturer des photons fortement diffusés. Enfin, le comptage de photons permet une étude quantitative simple des bruits expérimentaux. J'essaierai donc au final de démontrer que nous avons pu mesurer l'activité neuronale de façon optimale, en ayant un bruit limité uniquement par le bruit de photons et en utilisant en outre la correction des artefacts de mouvements permise par notre balayage rapide.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1 Montage

Le microscope à 2 photons utilisé durant ce travail de thèse a été complètement repensé par rapport au montage présent au début de ma thèse.

La source lumineuse est un laser Ti :Sapphire automatisé (Mai Tai Broadband, Spectra-Physics) délivrant une puissance de 2W pour des longueurs d'onde ajustables entre 710 et 990 nm. Une lame $\lambda/2$, montée en amont d'un polariseur fixe, est placée sur un moteur rotatif, ce qui permet d'ajuster la puissance de la source lumineuse entre 0 et $P_{\max} = 2W$. Un premier télescope composé de deux lentilles ($f_1=40\text{mm}$, $f_2=220\text{mm}$) permet ensuite d'obtenir un faisceau de 3mm de diamètre ($D=3\text{mm}$, mesuré à $1/e^2$). Un second télescope ($f_3=75\text{mm}$, $f_4=150\text{mm}$) placé entre le scanner résonnant et le miroir galvanométrique permet d'agrandir encore le faisceau ($D=6\text{mm}$). Un troisième télescope ($f_5=175\text{mm}$, $f_6=350\text{mm}$) fait passer le diamètre du faisceau à 12 mm de sorte à sous-couvrir légèrement la pupille arrière de l'objectif ($D=17.2\text{mm}$). Le système de balayage dans le plan XY est constitué d'un miroir galvanométrique classique d'ouverture 9x20mm (M-series, GSI) pour la direction Y couplé à un scanner résonnant (CRS series, GSI) d'ouverture 6x4mm pour la direction X. L'objectif utilisé est un Olympus Xlum X20 / N.A.=0.95 à immersion à eau. L'ensemble (scanners + objectif) permet de balayer des plans de dimension maximale 680 μm à une cadence maximale de 80Hz. Un miroir dichroïque (Chroma 750DCSPXR, 38x26mm, $\lambda_{\text{cut}}=750\text{nm}$) est placé à 45° juste avant l'objectif. Il transmet la lumière excitatrice dans l'infrarouge et réfléchit les photons verts du signal de fluorescence vers le système de détection.

La détection du signal de fluorescence a également été optimisée afin de capturer le plus grand nombre de photons possible (Oheim, Beaurepaire et al. 2001). Deux détections ont été successivement mises au point, l'une comportant 2 PMT (nommée « détection à 2 PMT » par la suite) et l'autre comportant 4 PMT (nommée « détection à

4PMT »). Nous avons utilisé des PMT avec une photocathode GaAsP à haute efficacité quantique (45% jusqu'à 650 nm) (Hamamatsu H7421-mod) (Wier, Balke et al. 2000; Benninger, Ashby et al. 2008). Ils ont été modifiés par rapport à la version standard (H7421) afin (i) d'abaisser leur PPR à 20 ns contre 70ns initialement et (ii) d'augmenter leur ouverture angulaire afin d'optimiser la collection des photons. Pour cela, le refroidissement Pelletier du PMT a été enlevé. En conséquence, leur compte d'obscurité est très faible, environ 1000 photons, mais plus élevé que la version standard (<100). Ces PMT ont une réponse linéaire jusqu'à des flux de photons de 5MHz (1/PPR). Ainsi ils sont linéaires dans la gamme de flux qui est permise avant la détérioration de son anode. Ces PMT ont en effet un courant d'anode maximum de 2 μ A. Dans la configuration des modules modifiés, le gain est fixé à 1-2 10^6 , ce qui correspond à un flux incident de 6MHz environ. Une utilisation au-delà de ce flux moyen n'est pas recommandée par le constructeur. La détection à 2 PMT permet donc de collecter des flux jusqu'à 12MHz et celle à 4 PMT des flux jusqu'à 24MHz, sans détériorer l'anode et tout en restant dans un régime linéaire pour le flux moyen collecté. Enfin la durée des impulsions TTL a été abaissée de 50ns à 8ns.

La détection à 2PMT est composée d'un télescope afocal (lentilles L7 de focale $f_7=150$ mm et de diamètre $D_7=50.8$ mm, lentilles f8 de focale $f_8= 40$ mm et diamètre $D_8=25.4$ mm) faisant l'image de la pupille arrière de l'objectif sur les PMT. Une lame semi réfléchissante permet de séparer le faisceau en deux afin de collecter les photons sur deux PMT (figure II.1). Chacun des photomultiplicateurs est équipé d'une roue-porte-filtre motorisée équipée d'un filtre vert (CHROMA, ET525/50M-2P) pour collecter le signal Oregon-Green (marquage OGB1 des cellules, voir partie II.2.6), d'un filtre rouge (CHROMA, ET605/70M-2P) pour collecter le signal Sulforhodamine (SR101, marquage spécifique des astrocytes, voir partie II.2.6). Un miroir pivotant permet de diriger le signal lumineux soit vers les PMT lors des enregistrements soit vers un système caméra-binoculaire pour faciliter le positionnement de l'échantillon (figure II.1).

Dans le cas de la détection à 4 PMT, nous avons modifié le module de détection afin d'y inclure les PMT supplémentaires. Cet ajout a nécessité l'utilisation d'une ligne optique fibrée innovante (figure II.2). En effet, pour des raisons évidentes d'encombrement, il n'était pas raisonnable d'ajouter les PMT supplémentaires directement au niveau de la détection initiale. Nous avons donc substitué l'un des deux PMT de la détection à 2 PMT par une ligne optique fibrée à quatre faisceaux. Le second PMT de la détection à 2 PMT est alors dédié au signal Sulforhodamine et la lame séparatrice 50/50 a été remplacée par un miroir dichroïque. La ligne fibrée est constituée d'une liasse de 1600 fibres optiques en entrée qui se séparent en quatre faisceaux équivalents de 400 fibres, chacun conjugué avec la photocathode d'un PMT à l'aide d'une lentille. L'entrée de la ligne est placée à l'endroit où se situait initialement la photocathode du PMT substitué, afin de collecter l'intégralité du flux lumineux incident.

L'ensemble du microscope est motorisé : l'échantillon est placé sur une platine motorisée $2D_{xy}$ (Luigs et Neumann, SMI) et l'objectif sur une translation $1D_z$ motorisée (Newport, platine M-UMRS.16 + VP25-AA) et commandée par la même interface ordinateur (position axiale Z de l'objectif, position XY de l'échantillon sous l'objectif, choix du filtre, puissance du laser).

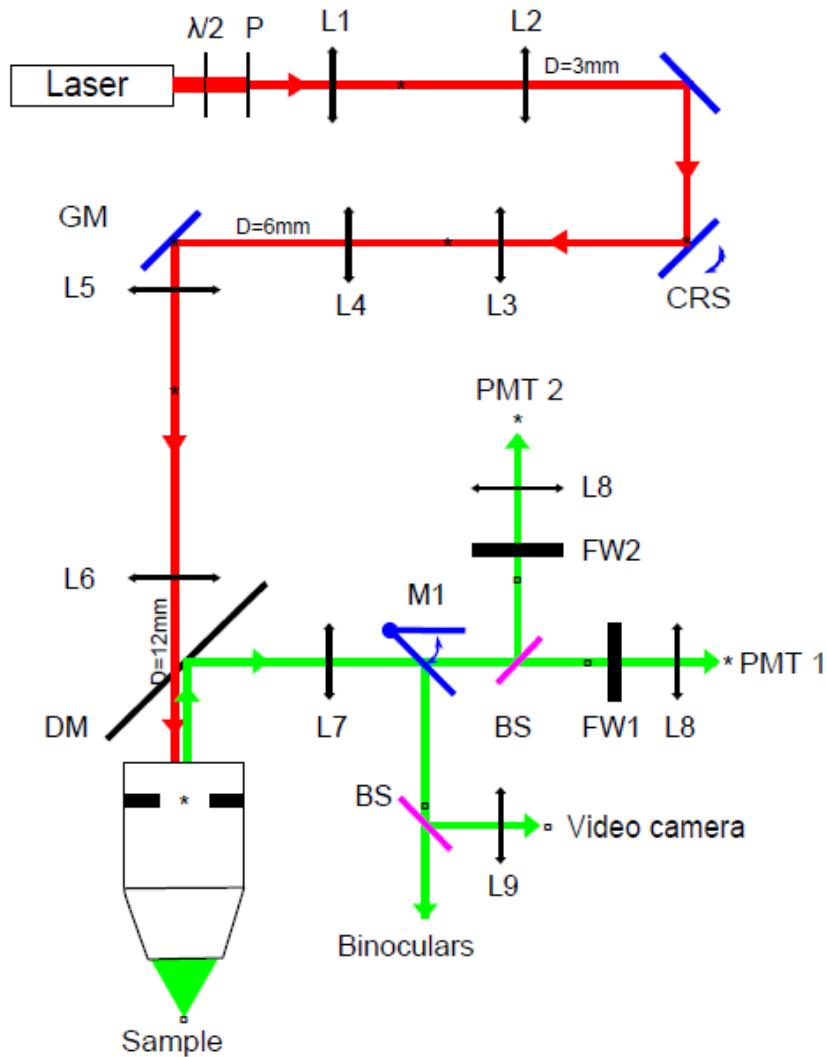


Figure II.1. : Schéma du microscope à deux photons avec la détection à 2 PMT. Notations. $\lambda/2$: lame $\lambda/2$, P : polariseur, L_i : lentilles, M_i : miroirs, CRS : scanner résonnant, GM : miroir galvanométrique, DM : miroir dichroïque, BS : lame semi réfléchissante, FW_i : Roues porte-filtres, PMT_i : photomultiplicateurs.

Dans le cas de la détection à 4PMT, BS est remplacé par un miroir dichroïque et le PMT 2 est remplacé par le faisceau de fibres optiques, auquel sont couplés les 4 PMT collectant le signal vert.

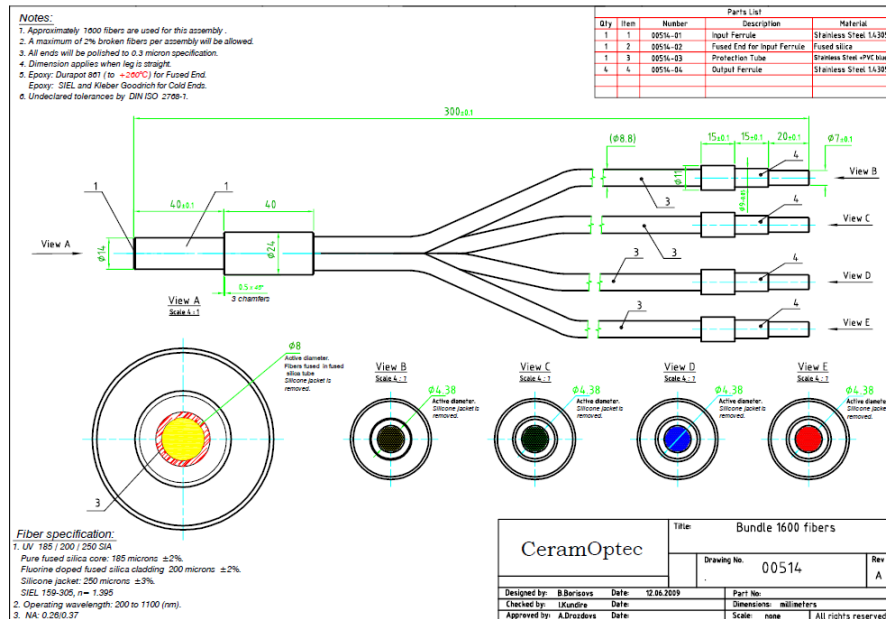


Figure II.2 : Faisceau de fibres optiques permettant d'implémenter 4 PMT.

II.2.2 Caractérisation de la collection des photons par la détection à 2 PMT

L'effet deux photons n'ayant lieu que dans le volume focal, pour enregistrer le signal de fluorescence à un instant t , il suffit de collecter tous les photons de fluorescence émis à cet instant t , ceux-ci ne pouvant provenir que du lieu de l'excitation malgré le fait qu'ils aient été multi diffusés par le milieu. Pour obtenir le meilleur rapport signal à bruit possible, il est donc primordial de collecter un maximum de photons émis par les sondes calciques. Pour de faibles profondeurs d'imagerie z_0 ($z_0 < r_f$, r_f étant la largeur effectif du champ imagé sur le détecteur), le caractère diffusant du milieu améliore la collection de photons par rapport à celle dans un milieu transparent. En revanche pour une profondeur d'imagerie au-delà de r_f , l'efficacité de la collection décroît quadratiquement avec la profondeur d'imagerie z_0 (Beaurepaire and Mertz 2002). Pour collecter un maximum de photon, il faut donc premièrement travailler avec la plus grande ouverture numérique possible et deuxièmement imager sur le détecteur le plus grand champ effectif possible. Dans mon montage, les photons de fluorescence sont collectés par le télescope de détection en conjuguant la pupille arrière de l'objectif (par laquelle passent tous les photons collectés par l'objectif) avec les photocathodes de deux photomultiplicateurs H7421-mod (détection à 2 PMT). Ce problème s'avère difficile dans le cas de ces PMT, car leur photocathode est de taille limitée, 5mm, en comparaison de celle des PMT standards (typiquement 1 pouce) alors que la pupille des objectifs utilisés en microscopie à deux photons est grande (typiquement 17.2mm dans notre cas) et que l'on veut capturer des angles importants venant de cette pupille (la collection des photons venant d'un champ effectif large de 1mm de côté correspond à des angles de 3° environ). Pour cette raison, nous avons fait augmenter l'angle d'acceptance du PMT, en retirant le système de refroidissement (figure II.3).

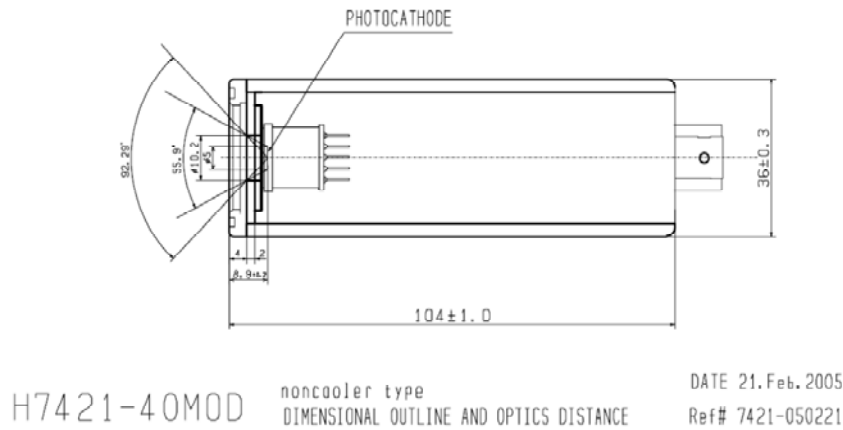


Figure II.3 : Photomultiplicateur Hamamatsu H7421-40mod.
 Par rapport à la version standard, sa PPR est réduite de 70 à 20ns, la largeur des pulses TTL est réduite de 30 à 8ns et leur amplitude de 3 à 2,1V.

Le télescope ($f_7=150\text{mm}$, $f_8=40\text{mm}$, grossissement 0.3) optimise donc la collection d'un champ large afin de capturer le maximum de photons émis par le point source et diffusés par le tissu. Lors des enregistrements dans les couches II/III du cortex à tonneaux, l'imagerie se pratiquant à des profondeurs typiques de $300\mu\text{m}$, il fallait s'assurer que le champ effectif imagé par la détection était d'au moins $300\mu\text{m}$. A l'aide d'une source laser fibrée (considérée comme ponctuelle), j'ai vérifié expérimentalement la position radiale maximale d'un point source dont tous les photons émis sont détectés par mon montage : $r_{\text{max}} = 650\mu\text{m} \pm 10\mu\text{m}$ (figure II.4). Cette valeur est cohérente avec celle obtenue théoriquement en simulant mon montage sur le logiciel Zemax©. Ceci montre en particulier que les aberrations optiques du télescope de détection ne limitent pas le champ capturé.

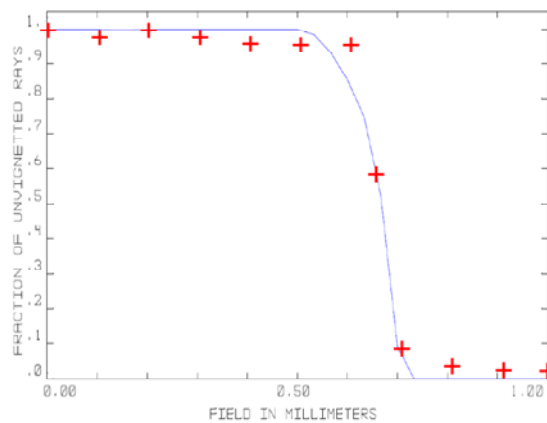


Figure II.4 : Fraction des photons émis par une source ponctuelle et collectés par le microscope en fonction de la position de la source (laser fibré) par rapport au centre du champ imagé.
 Courbe bleue : simulation Zemax, croix rouge : mesures expérimentales

Pour capturer un grand champ effectif, des lentilles de focales assez courtes ont été utilisées. Néanmoins il était nécessaire d'insérer sur le trajet ; 1) une lame séparatrice afin de collecter l'ensemble du flux de photons sur deux photomultiplicateurs ; 2) un miroir pivotant immédiatement après la première lentille du télescope de détection pour orienter le faisceau soit vers les PMT, soit vers une lame semi-réfléchissante qui redistribue la lumière vers une caméra d'une part et une lunette binoculaire d'autre part ; 3) Des roues portes filtres motorisées juste devant les PMT, afin de pouvoir observer le même fluorophore sur les deux PMT ou deux fluorophores différents simultanément (figure II.5).

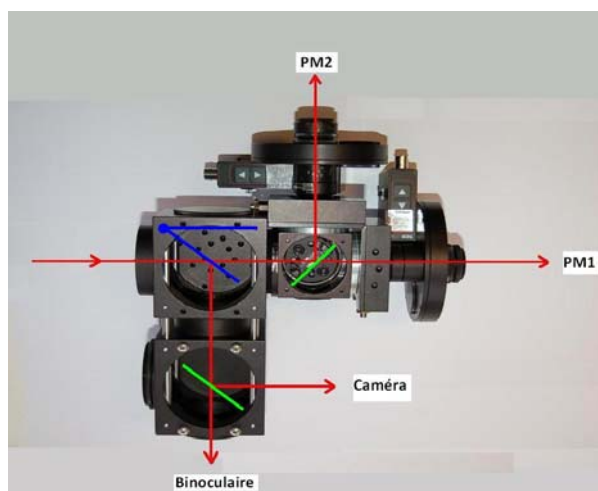


Figure II.5 : Photographie et schéma de la détection avec l'orientation des faisceaux lumineux vers les différents éléments pour la détection à 2 PMT.

II.2.3 Résolution spatiale

L'ouverture numérique (NA) du montage est cruciale. En effet, quelque soit la profondeur à laquelle est faite l'imagerie, la puissance de la fluorescence collectée est fonction de θ_{NA}^2 (Beaurepaire and Mertz 2002) d'où l'importance de travailler avec la plus grande ouverture numérique possible.

Il est également important de perdre le minimum de puissance laser lors de la traversée des différents éléments optiques afin de ne pas limiter la profondeur d'imagerie. L'élément limitant de notre montage est la pupille arrière de l'objectif qui, puisqu'elle définit l'ouverture numérique (NA) et détermine la résolution spatiale du montage. Compte tenu du caractère Gaussien du profil radial d'intensité, et par conséquent de l'impossibilité à couvrir parfaitement la pupille arrière de l'objectif qui en résulte, il faut donc trouver un compromis entre résolution et puissance transmise. Pour augmenter la profondeur d'imagerie tout en conservant une grande résolution axiale, il est donc nécessaire d'utiliser une ouverture numérique effective plus petite que l'ouverture totale de l'objectif (Dunn, Wallace et al. 2000; Helmchen and Denk 2005).

La réponse impulsionnelle (PSF) 3D du microscope en fonction du taux de couverture T de l'ouverture numérique NA et de la longueur d'onde λ est donnée par la formule suivante (Helmchen and Denk 2005):

$$PSF(v, u) = \left| 2 \int_0^1 P(\rho) \cdot J_0(v\rho/2) \cdot e^{iux\rho^2/4} \cdot \rho \cdot d\rho \right|^4 \quad (II.1)$$

Avec J_0 la fonction de Bessel d'ordre 0, z la coordonnée axiale, r le rayon dans le plan latéral, $v = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot NA \cdot r$, $u = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot NA^2 \cdot z$ et $P(\rho) = e^{-\rho^2/T^2}$ où T est le taux de couverture de la pupille par le laser : $T = D_{\text{faisceau}}/D_{\text{pupille}}$.

Les expériences ont été menées avec un objectif à immersion Olympus XLum 20X présentant une ouverture numérique de 0.95 et une pupille arrière de 17.2mm de diamètre. Si la pupille arrière était parfaitement sur-couverte par le faisceau d'excitation ($T=\infty$), les résolutions théoriques en fonction des caractéristiques du montage ($NA=0.95$, $\lambda=900\text{nm}$ et indice de réfraction $n=1.33$ pour l'eau) seraient les suivantes :

$$FWHM_{xy} = 0.688\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$$

$$FWHM_z = 1.215\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$$

Cependant, sur-couvrir parfaitement la pupille implique une perte de puissance transmise et donc une limitation de la profondeur d'imagerie accessible. Le diamètre du faisceau laser au niveau de la pupille arrière de l'objectif est donc ajusté afin d'obtenir un taux de couverture $T = D_{\text{faisceau}}/D_{\text{pupille}}$ de 0.7 environ permettant ainsi une transmission quasi complète de la puissance laser (86%) avec des pertes de résolutions axiales et latérales limitées.

Ainsi les résolutions axiales et latérales théoriques dans nos conditions sont $FWHM_{xy} = 0.843\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$ et $FWHM_z = 2.826\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$ (figure II.6).

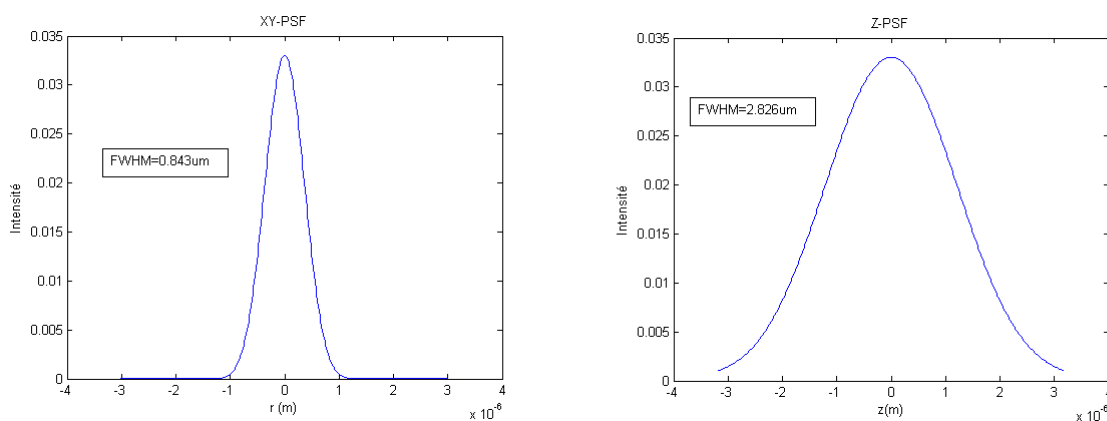


Figure II.6 : Résolutions latérales (XY) et axiales (Z) théoriques de notre microscope. Pour un taux de couverture de 0.7 et un objectif de $NA=0.95$ utilisé avec une longueur d'onde $\lambda=900\text{nm}$: $FWHM_{xy} = 0.843\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$ et $FWHM_z = 2.826\mu\text{m} \pm 0.002\mu\text{m}$.

Expérimentalement, en mesurant la réponse impulsionnelle du microscope en imageant des billes fluorescentes de diamètre 200nm, nous obtenons une résolution axiale $FWHM_z=3.5\mu\text{m} \pm 0.5\mu\text{m}$ et une résolution latérale (dans le plan) $FWHM_{xy}=0.8\mu\text{m} \pm 0.05\mu\text{m}$ pour une lumière excitatrice à 900 nm (figure II.7). La résolution axiale bien que légèrement supérieure à la valeur théorique est alors suffisante pour minimiser la contamination par le neuropil lors de l'imagerie d'un corps cellulaire (Kerr, Greenberg et al. 2005; Waters and Helmchen 2006) car la PSF axiale est bien plus petite que la dimension axiale typique d'un neurone cortical.

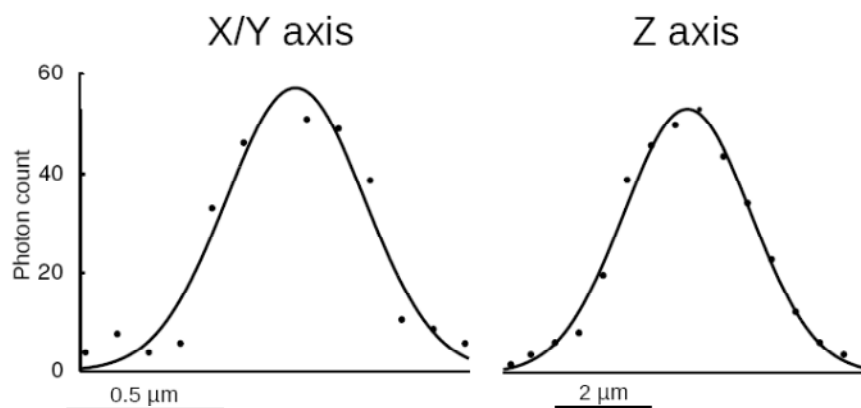


Figure II.7 : Résolutions latérales et axiales expérimentales de notre microscope. La résolution est définie comme la FWHM de la réponse impulsionnelle mesurée sur des billes fluorescentes de 200 nm de diamètre (points noirs : mesure pour une bille, courbe noire : fit pour N=74 billes) La résolution latérale (xy) correspond à la FWHM du profil d'intensité lumineuse d'une bille dans le plan xy et la résolution axiale (z) correspond à la FWHM du profil représentant le maximum d'intensité d'une bille dans le plan xy en fonction de z.

II.2.4 Acquisition rapide d'images et visualisation en temps réel

Le système de balayage dans le plan est composé d'un miroir galvanométrique classique (direction Y) et d'un miroir résonnant (direction X). La taille totale du champ excitable est de 680 μm . Le scanner résonnant oscille à la fréquence CRS_f de 7,910 kHz indépendante de la taille du champ. Durant une période, il effectue un aller et un retour (deux lignes). Lors de l'acquisition, on peut alors choisir indépendamment les trois paramètres que sont la taille du champ imagé (jusqu'à 680 μm), la fréquence d'acquisition des images (jusqu'à 100 Hz) et le nombre de pixels par ligne. L'utilisation d'un scanner résonnant permet ainsi d'obtenir une fréquence d'imagerie élevée y compris sur de grands champs. À une fréquence d'acquisition et une taille de champ donné, on peut ajuster le nombre de pixels par ligne qui les composent. Compte tenu de notre problématique, il faut idéalement imager le plus grand champ possible (pour avoir le plus d'information spatiale possible) à la plus grande fréquence d'acquisition possible (pour résoudre au mieux temporellement les transitoires calciques) tout en gardant un nombre de pixels permettant de résoudre au mieux les corps cellulaires ($\approx 1\mu\text{m}/\text{pixel}$ correspondant à une

centaine de pixels par soma des neurones). En effet, pour les algorithmes de tracking des mouvements, il est important d'avoir une définition raisonnable des cellules. Le tableau 1 résume les fréquences d'acquisition obtenues en fonction du nombre de lignes N_{LY} suivant Y. Le nombre N_Y de pixels suivants la direction Y est donné par N_{LY}/B_Y , où B_Y est le coefficient de somation sur la ligne Y.

Frame rate (Hz)	N_{LY} and N_Y ($B_Y=1$)	N_Y ($B_Y=2$)	N_Y ($B_Y=4$)
100	160	80	40
80	200	100	50
40	400	200	100
20	800	400	200
10	1600	800	400

Tableau 1: Caractéristiques des images (nombre de lignes par image) acquises pour différentes valeurs de cadence d'image et de bin suivant Y

Cette fréquence d'acquisition des images est associée à une grande résolution en termes de pixels. Ainsi, des images acquises à 100Hz se composent de 160 lignes, ce qui correspond à un pixel de $1.25\mu\text{m}$ suivant Y pour un champ de $200\mu\text{m}$ de côté. Suivant X, le nombre de pixels N_X est déterminé par la PCF (pixel clock frequency) choisie et par la linéarisation nécessaire compte tenu du caractère sinusoïdal du balayage (voir plus loin). Après linéarisation, $N_X=0.641(PCF/CRS_f)$. Nous pouvons effectuer une acquisition (avec enregistrement continu des données) en utilisant une PCF jusqu'à 10MHz générée par une carte d'acquisition Labview© PCI-e 6363. Les valeurs typiques de N_X sont données dans le tableau 2 montrant bien qu'une haute résolution spatiale suivant l'axe X peut également être obtenue et ce indépendamment de la fréquence d'acquisition des images. La plupart de nos enregistrements ont été effectués sur des champs de $150\mu\text{m}$, avec une fréquence d'image de 40Hz donnant des images de 400×400 pixels.

PCF(MHz)	N_X
10	400
5	200
2.5	100
1	40

Tableau 2: Valeurs de N_X pour quatre valeurs typiques de PCF

Compte tenu de la complexité de l'expérience dans son ensemble, un maximum de commandes une fois l'animal en place sous le microscope a été automatisé. Ainsi, excepté le réglage de la longueur d'onde du laser (fixée au début de l'expérience), l'ensemble des commandes nécessaires au positionnement de l'animal puis à l'enregistrement des données (puissance du laser, position X, Y et Z du champ imagé, choix des filtres, de fluorescence, paramètres des images...) sont pilotés via une interface Labview© unique.

L'écriture de ce programme d'acquisition Labview© nous a également permis d'inclure un module d'affichage en temps réel extrêmement utile pour le bon déroulement de l'expérience. Les images enregistrées sont jouées à quelques Hertz ($\approx 4\text{Hz}$), ce qui fournit un gain de temps considérable pour toutes les étapes de positionnement de l'animal, de vérification des marquages (Oregon Green et Sulforhodamine), de choix des lieux d'enregistrement etc.... et permet de garder un contrôle en temps réel du bon déroulement des enregistrements (perte de focus, photo-blanchiment...).

La fréquence d'affichage des images a été volontairement limitée à quelques Hz. Cette fréquence est en effet suffisante pour les opérations évoquées précédemment et ménage par ailleurs la mémoire vive de l'ordinateur. En effet, les enregistrements que nous effectuons génèrent de gros volumes de données (plusieurs Go par heure d'enregistrement). Les choix des différents paramètres ont donc été optimisés afin d'être capable d'acquérir des données de gros volume, de les visualiser, tout en les enregistrant sur disque dur.

II.2.5 Analyse des images

Linéarisation

Le balayage du scanner résonnant est sinusoïdal et donc non linéaire. Ainsi, lors de la résonance la vitesse du miroir est plus grande lorsqu'il balaye le milieu de l'image que lorsqu'il arrive sur les bords puisqu'il doit repasser par un point de vitesse nul avant de repartir dans l'autre sens. En conséquence, les pixels situés sur les bords de l'image sont intégrés pendant plus longtemps que ceux du centre induisant un effet d'étirement de l'image aux bords. (figure II.8.a) Pour obtenir une image exploitable pour l'analyse (figure II.8.b) il faut donc procéder a posteriori à la linéarisation des images acquises.

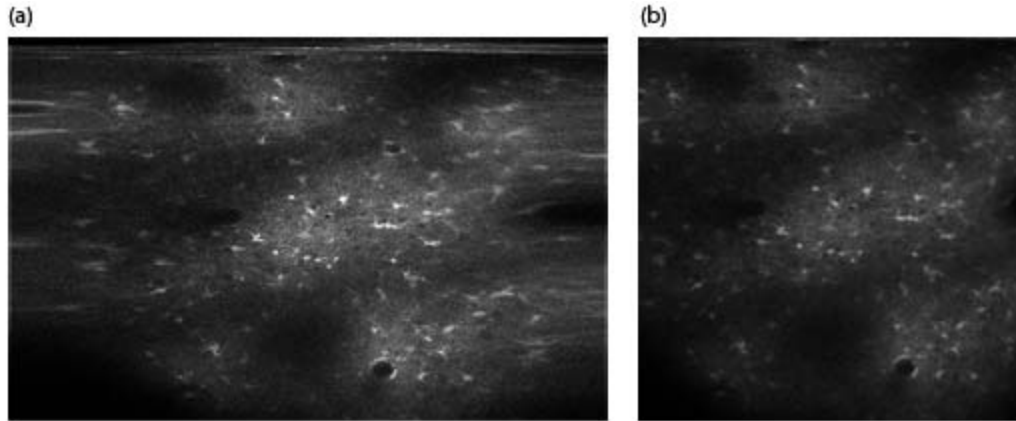


Figure II.8 : linéarisation des images.

(a) Image brute, le champ réel est un carré de $650 \mu\text{m}$ de côté.

(b) Image linéarisée spatialement.

Détermination des ROI

Nous avons vu que le fait d'enregistrer des images (full frame microscopy) permettait de recalibrer spatialement l'origine des signaux de fluorescence. Chaque enregistrement commence par la réalisation d'un stack de référence de 60 images centrées en x , y et z sur le plan où a lieu l'enregistrement (une image tous les $1 \mu\text{m}$ en z). Toutes les cellules présentent un marquage vert OGB-1 mais les astrocytes présentent en plus un marquage spécifique rouge à la Sulforhodamine SR101 (voir partie II.2.6). Les signaux vert OGB-1 et rouge SR101 sont enregistrés simultanément.

Afin d'enregistrer convenablement le signal de fluorescence lors du traitement des images il est nécessaire de bien définir les pixels définissant le corps cellulaire de chaque neurone : la zone d'intérêt (ROI). Le centre des neurones est défini manuellement dans un premier temps puis nous avons utilisé un logiciel dédié (Peng, Ruan et al. 2010) qui, à partir des stacks Oregon-Green (représentant toutes les cellules) et SR101 (représentant uniquement les astrocytes), ré-affine la position exacte du centre de chaque cellule et définit le volume d'un soma comme une sphère de diamètre D . Les ROI sont ensuite réduites à un cylindre vertical de diamètre D_c et de hauteur H (Figure II.9). D_c est défini comme le diamètre tel que l'intensité lumineuse maximale située au centre du disque inclus dans le plan XY est divisée par 2 ($I(r=D_c/2)=I_0/2$ avec I_0 l'intensité maximale). Compte tenu de la contamination du signal par les couches supérieures, le profil axial de fluorescence est asymétrique par rapport au plan XY . En observant le signal de fluorescence sur la couronne $D_c/2 < r < D$ (plus sensible aux variations axiales du signal que le disque $r < D_c/2$), nous définissons h_h la hauteur située au-dessus du plan XY et qui divise par 2 l'intensité maximale observée sur cette couronne dans le plan XY ($I(z=h_h) = I(z=0)/2$). h_b est définie de la même manière pour les couches situées en-dessous du plan XY . La hauteur H est alors définie telle que $H=h_h+h_b$.

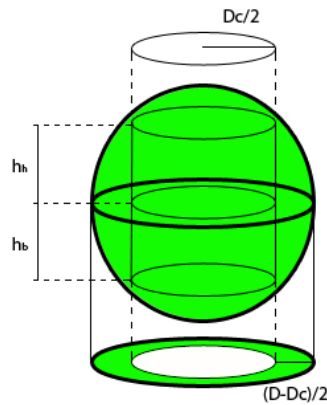


Figure II.9 : Détermination des ROI. Le signal de fluorescence issu d'un neurone assimilé à la sphère de diamètre D est enregistré sur le cylindre de diamètre D_c et de hauteur $H=h_h+h_b$.

Nous avons choisi ce type de ROI pour deux raisons principales. Premièrement, en microscopie à deux photons la résolution axiale est moins bonne que la résolution latérale ($3.5 \mu\text{m}$ contre $0.8\mu\text{m}$ dans notre cas) ce qui implique une contamination par le neuropil des parties inférieures et supérieures de la ROI sphérique originale. En prenant un cylindre de hauteur H et de diamètre D_c , nous obtenons alors une ROI de dimension typique d'un neurone ($\approx 10\mu\text{m}$, figure II.10). Par ailleurs, nous nous sommes aperçus que de grandes variations dans le compte de photons apparaissaient quand la section dans laquelle est recalée l'image enregistrée varie (en z) au cours d'un enregistrement. Ces variations induisent alors un bruit artificiel du fait de la variabilité du nombre de pixels par ROI, bruit qui disparaît dès lors qu'on utilise une ROI cylindrique, c'est-à-dire de section constante en fonction de l'altitude z .

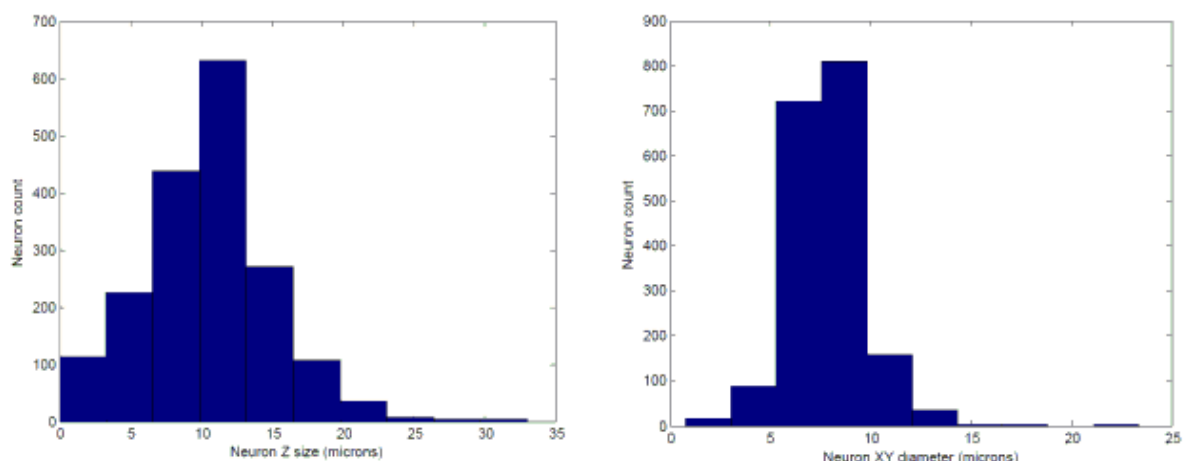


Figure II.10 : Distributions des tailles axiales et latérales des ROI définies. Les dimensions moyennes des ROI sont : $D_{xy} \approx 8\mu\text{m}$ et $D_z \approx 11\mu\text{m}$

Correction des artefacts dus au mouvement

Entre chaque image de l'enregistrement, il peut se produire de légers mouvements suivant les axes x , y et z . Ces mouvements sont notamment dus aux rythmes physiologiques de l'animal (respiration, rythme cardiaque...). Des stacks de référence OG (marquage Oregon Green) et SR101 (marquage à la Sulforhodamine des astrocytes) obtenus avant l'enregistrement de l'activité nous permettent de mesurer ces mouvements. La mesure des déplacements au cours du temps est obtenue en corrélant les images d'activité à chaque pas de temps aux stacks de référence en 3D (Figure II.11). Afin d'augmenter le rapport signal à bruit lors de cette phase de recalage, nous avons « binné » les images spatialement (2x) et temporellement (x4). Pour chaque image du film d'activité, la position xyz maximisant la corrélation avec le stack OG est ainsi retenue. Lors de l'analyse, nous recalons spatialement les films en inversant les mouvements mesurés. Notons que l'effet des mouvements dans le plan et hors du plan est très différent. Les mouvements dans le plan sont entièrement compensés (la ROI est toujours recalée sur le neurone), mais des déplacements axiaux trop grands font que certaines cellules sont sorties du champ d'observation (le recalage en z de la ROI n'est plus suffisant) et sont remplacées par d'autres neurones sectionnés suite au déplacement de l'échantillon.

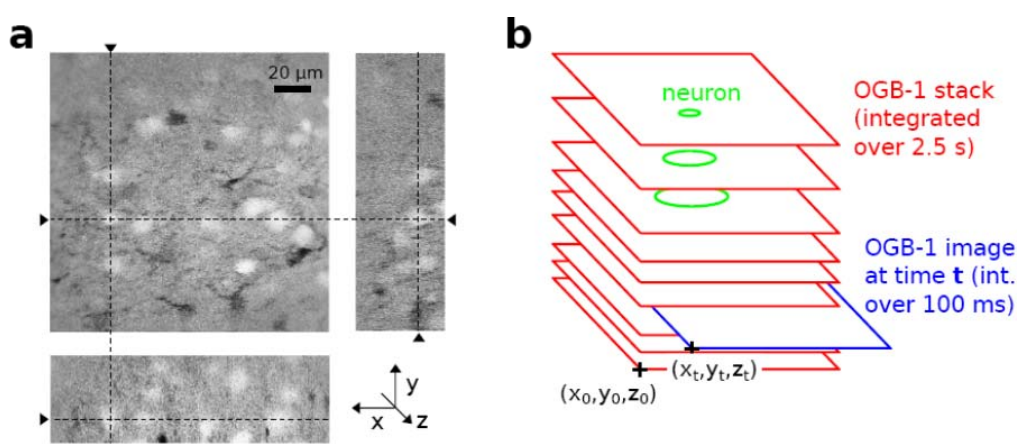


Figure II.11. : Correction spatio-temporelle des images.

(a) Un stack de référence de $60 \mu\text{m}$ d'épaisseur et centré sur le plan d'acquisition est acquis simultanément sur les deux voies OGB-1 et SR101 (non montré)

(b) Principe de repositionnement spatial d'une image acquise à un temps t par rapport au stack de référence par corrélation de l'image avec le stack de référence OGB-1.

II.2.6 Chirurgie

Procédures chirurgicales

Toutes les procédures chirurgicales sont conformes à la législation française (décret n°97/748 du 19 octobre 1987) aux indications sur le soin et l'utilisation des animaux de la Communauté Européenne (86/609/CEE, CE official journal L358, 18 décembre 1986) et aux recommandations du CNRS.

Les expérimentations ont porté sur des rats Sprague Dawley âgés d'environ 12 semaines (400 à 500 grammes). Les animaux sont anesthésiés sous 3% d'isoflurane dans un mélange d'oxygène (20%) et de protoxyde d'azote (80%). Le rat est profondément anesthésié lors de la phase de chirurgie puis le niveau d'isoflurane est progressivement abaissé au cours l'expérience (0.8 à 1% en fin d'expérience) afin de maintenir le niveau d'anesthésie souhaité lors des enregistrements.

ECG et EEG sont enregistrés tout au long de l'expérience. L'animal est également maintenu à une température de 37,7°C à l'aide d'un système chauffant autorégulé.

Le crâne est rasé, puis la peau est incisée sur 4 cm suivant la direction rostro caudale. Le crâne est mis à nu afin de repérer la position bregma correspondant au point de jonction entre les sutures sagittales et coronales. Le centre de la région du cortex à tonneaux est repéré à l'aide des coordonnées stéréotaxiques : +2mm en arrière de bregma et +6 mm en latéral, position sur laquelle est centrée la craniotomie carrée (2x2mm) (Figure II.12).

Préalablement à l'ouverture du crâne, le système de contention comportant la chambre d'enregistrement est fixé sur l'os à l'aide de ciment dentaire. Une fois l'excédent de ciment et l'os retirés, la chambre d'enregistrement est remplie d'une solution extracellulaire et la dure-mère est incisée afin de mettre le cortex à nu. Les sondes calciques sont injectées, le marquage à la sulforhodamine SR101 effectué (incubation pendant trois minutes d'une solution 100µM directement sur le cortex, (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2004)) et une lamelle en verre est scellée sur la chambre d'enregistrement afin de maintenir le cortex en place. Durant toute la phase de chirurgie et d'injection des sondes calciques, le cortex est immergé dans une solution saline de composition : NaCl (125 mMol), KCL (2,5 mMol), NAHCO₃ (26 mMol), NaH₂PO₄ (1,25 mMol), CaCl₂ (2 mMol), MgCl₂ (1 mMol), glucose (20 mMol).

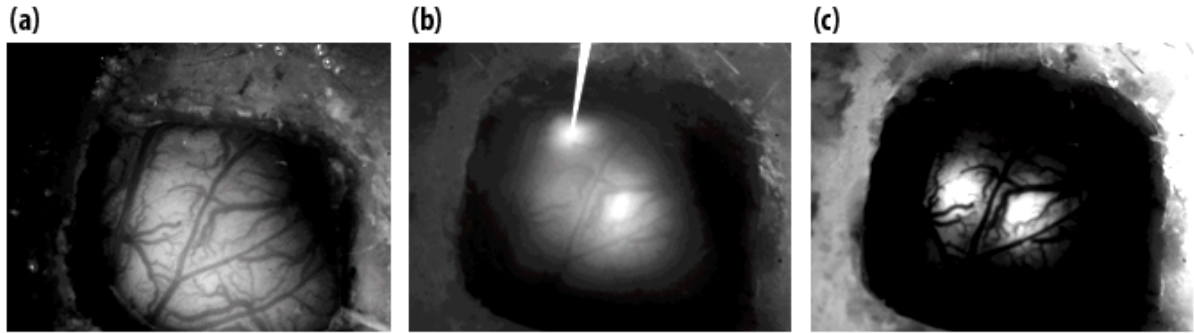


Figure II.13 : Nouveau système d'injection.

(a) Image de la craniotomie en lumière blanche.

(b) Image de l'injection en temps réel, l'Alexa fluor rouge présent dans la solution injectée permet de visualiser l'injection et d'en contrôler la qualité et la quantité. On observe un site (3) en train d'être marqué (au lieu de la pipette, en haut) ainsi qu'un second site (2) marqué quelques minutes plus tôt (au centre). Le premier (1) site injecté (juste au-dessous de la pipette) n'est déjà plus visible, l'Alexa fluor s'étant diffusé dans le milieu extra cellulaire.

(c) Image du marquage Oregon Green. Le site (1) est bien marqué, de même que le site (2). Le site (3) en cours d'injection n'apparaît pas encore marqué du fait du délai nécessaire pour que les sondes pénètrent les cellules et réagissent avec le calcium intracellulaire. Les images (b) et (c) ont été prises à quelques secondes d'intervalle.

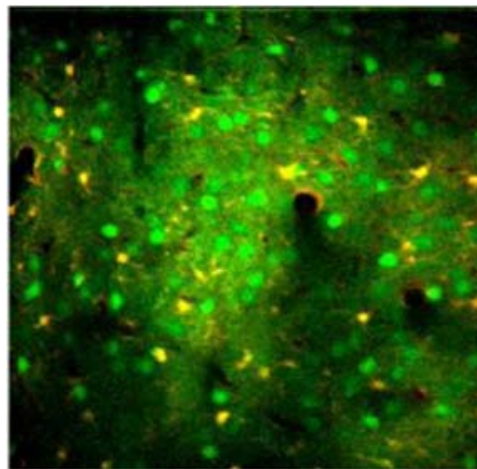


Figure II.14 : Marquage spécifique des astrocytes.

Toutes les cellules sont marquées par OGB1 mais seuls les astrocytes sont marqués par la sulforhodamine. Ces derniers apparaissent donc orange tandis que les neurones sont en vert. (champ de 300 μm)

Système de contention limitant les bruits mécaniques

Dans les expériences *in vivo*, il est apparu que des mouvements physiologiques dus à la respiration ou au rythme cardiaque étaient transmis au cortex et contaminaient le signal fluorescent. Bien que les images soient repositionnées suivant les trois dimensions xyz par rapport au stack de référence grâce à notre algorithme de tracking, il était

important au préalable de limiter au maximum la transmission des mouvements physiologiques de l'animal au niveau du cortex.

Le système de contention consistait initialement en un cadre stéréotaxique où le rat était maintenu par trois points : un mord au niveau des incisives supérieures et du nez ainsi que deux barres d'oreilles. L'animal était donc contraint en trois points du crâne tous distants de un à plusieurs centimètres de la zone d'enregistrement ce qui compte tenu des bras de leviers potentiels ne constituait pas un système de contention idéal du point de vue de la stabilisation mécanique du lieu d'enregistrement.

En conséquence, j'ai développé un nouveau système de contention intégrant la chambre d'enregistrement (figure II.15). Elle se compose d'une plaque métallique rigide percée qui se colle directement sur le crâne au lieu de la craniotomie et qui est solidement fixée au support par ses deux extrémités. La zone d'enregistrement est ainsi maintenue au plus près limitant tout effet de bras de levier.

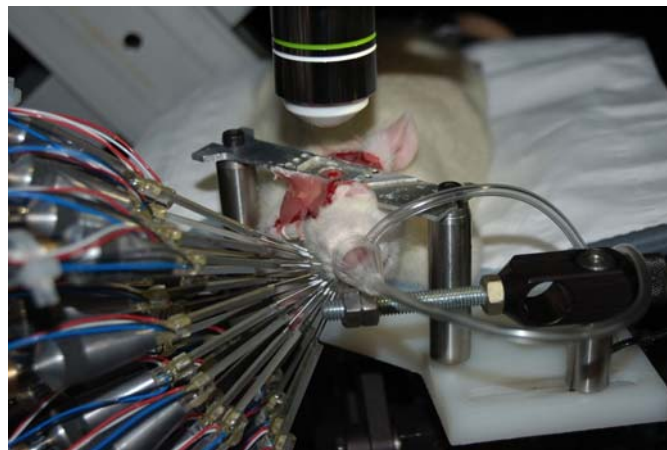


Figure II.15. : Système de contention.

Une plaque métallique comportant la fenêtre d'enregistrement est collée directement sur le crâne et fixée solidement par ses deux extrémités imprimant la contention au plus près de la zone d'enregistrement.

II.2.7 Modélisation du bruit de photons :

Effet de la « Pair Pulse Resolution »

Le bruit de photons est dû à la distribution Poissonnienne des photons et dépend uniquement du flux de photon moyen ϕ et du temps de mesure T du capteur. Cependant, les PMT ont une PPR qui empêche de mesurer deux photons séparés par un temps inférieur à la PPR. En conséquence une modélisation du bruit dans un système de détection en comptage de photon doit considérer l'effet de la PPR. Pour T bien plus grand que la PPR, il existe une expression analytique du compte corrigé CC en fonction du compte réel RC de photons ($RC=\phi.T$) et également pour la variance σ de CC en fonction

de la variance du compte réel (\sqrt{RC}). Nous parlons alors d'« approximation analytique » (Müller 1973).

$$CC = \frac{RC}{1+RC*\frac{PPR}{T}} \quad \text{Eq. (II.2)}$$

$$\sigma^2 = \frac{RC}{(1+RC*\frac{PPR}{T})^3} \quad \text{Eq. (II.3)}$$

Cependant, quand T se rapproche de l'ordre de grandeur de la PPR, l'expression (II.3) n'est plus valide. Pour modéliser la détection dans ce cas, nous avons utilisé deux approches. La première est basée sur la distribution exacte des comptes en présence d'une PPR finie. Nous parlons alors de « modèle analytique réel ». La seconde approche est basée sur une simulation numérique. Nous avons simulé sous MATLAB © une arrivée Poissonnienne de photons et supprimé les photons arrivant après un temps t inférieur à la PPR par rapport au photon précédant, obtenant ainsi une distribution de Poisson tronquée. Ensuite nous avons mesuré la distribution des comptes sur notre détecteur, la valeur moyenne et la variance de cette distribution tronquée simulée. Nous parlons ici de« simulation numérique ».

Nous avons vérifié que les trois modèles étaient bien valides et cohérents dans la limite $T \gg PPR$. Les valeurs moyennes et les variances sont égales (figure II.16) (T tests $p < 0.05$). Nous avons ensuite vérifié que le modèle analytique et la simulation numérique étaient cohérents en termes de variance et de valeur moyenne dans le cas de petites valeurs de T (figure II.16). Finalement, à partir de ces courbes nous avons déterminé la valeur limite $(T/PPR)_{\min}$ à partir de laquelle l'approximation analytique devient valable et peut donc être utilisée. Un critère de 10% de précision sur la mesure de la valeur moyenne et de la variance donne:

$$(T/PPR)_{\min} = 15 \quad \text{Eq. (II.4)}$$

Dans nos expériences, la PPR est de 20ns et nous avons comparé théoriquement nos résultats à ceux obtenus avec un PMT H7421 standard dont la PPR est de 70ns. Une fréquence de rafraichissement des pixels maximum de 10MHz (100ns) a été utilisée mais dans la plupart des cas les comptes étaient intégrés sur des régions d'intérêts (ROI) de plusieurs dizaines de pixels. En fonction du champ imagé et de la taille des neurones la période d'intégration T variait de 1 à 500 μ s. Nous avons vérifié (numériquement et expérimentalement) que le flux et le bruit mesurés pendant une période T correspondant à N pixels de durée t telle que $T=Nt$ étaient les mêmes que ceux mesurés avec une horloge de pixel plus longue $t'=T$. En conséquence, l'expression analytique est valide dans la plupart des cas rencontrés ($PPR=20ns$, $T>300ns$) et nous l'utiliserons pour modéliser le bruit des images obtenues.

Dans notre cas, notre détection comporte deux ou quatre PMT. Pour modéliser le signal et le bruit mesuré, pour un flux incident total φ , nous considérons que le flux arrivant sur chaque PMT vaut $\varphi/2$ (ou $\varphi/4$).

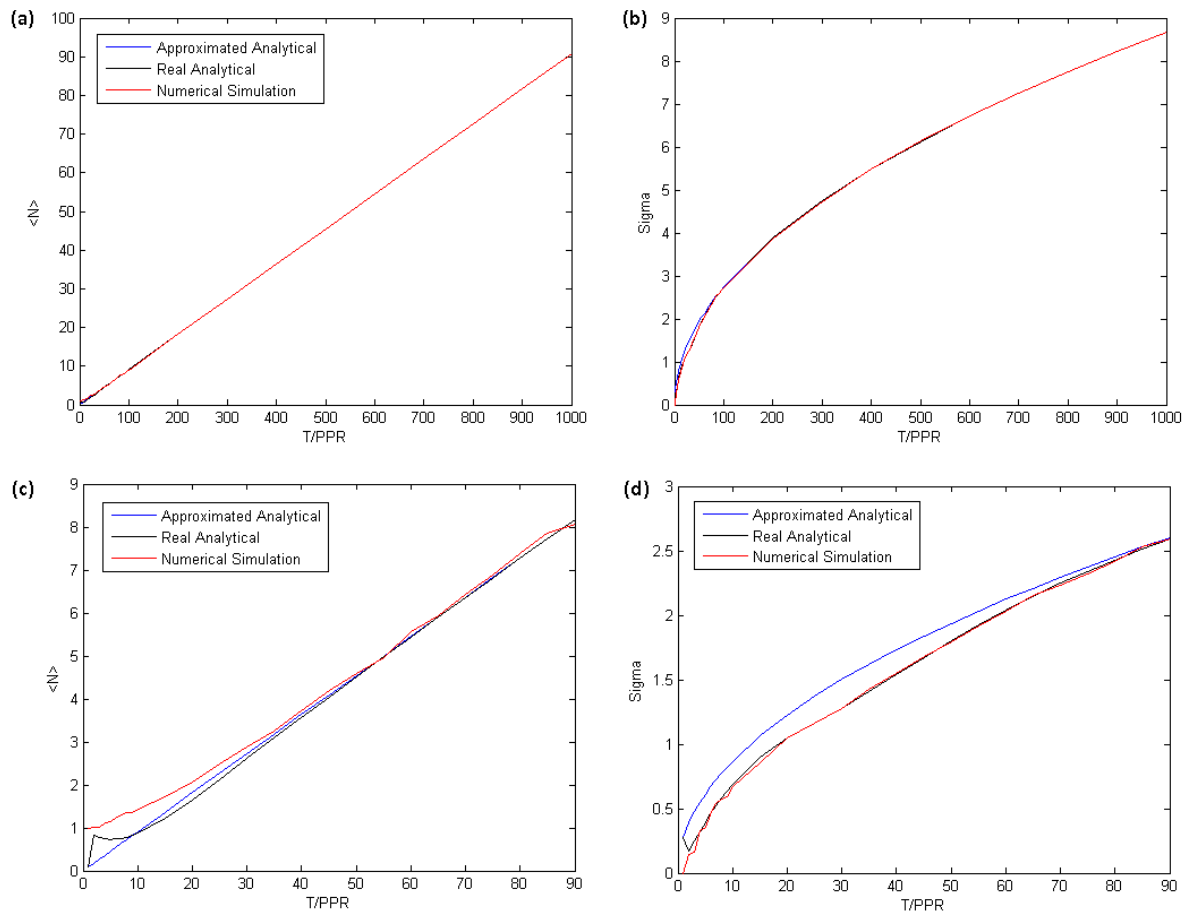


Figure II.16. : Valeur moyenne et variance du compte de photons pour les trois modèles (noir : modèle analytique réel, bleu : approximation analytique, rouge : simulation numérique). Valeur moyenne et variance sont calculées pour un flux incident $\varphi=5\text{MHz}$, une horloge de pixel de 10MHz .

(a) : Valeur moyenne du nombre de photons comptés en fonction de $\frac{T}{PPR}$

(b) : Variance du nombre de photons comptés en fonction de $\frac{T}{PPR}$

(c) et (d) : Figures (a) et (b) zoomées pour les valeurs de T_{ech}/PPR comprise entre 0 et 90.

II.3. Résultats

II.3.1 Modélisation du rapport signal sur bruit

Dans le cas d'un transitoire calcique évoqué par un potentiel d'action au soma des neurones, la variation typique du signal de fluorescence est de l'ordre de 10%. Nous avons analysé à partir de notre modèle le rapport signal sur bruit avec lequel un tel transitoire peut théoriquement être détecté, en considérant donc que le signal est une variation instantanée de 10% du flux incident de photons et que le bruit est uniquement dû au bruit de photons.

Notre raisonnement est basé sur la volonté de détecter des transitoires individuels avec la meilleure résolution temporelle possible. La durée d'un transitoire étant d'environ 500ms, on peut noter qu'il est toujours possible *a posteriori* de binner temporellement les images. En diminuant ainsi le bruit de photons, on pourrait améliorer encore la détection en amplitude des transitoires au détriment de la précision temporelle sur cette détection. Cependant les calculs présentés sont faits image par image afin de garder la meilleure résolution temporelle possible.

J'ai en premier lieu étudié l'apport de notre montage à 2 PMT modifiés. La figure (II.17.a) montre le nombre de photons comptés sur une ROI typique dans nos expériences (soma d'un neurone scanné pendant 200 μ s). On observe que notre système de détection à 2 PMT permet de compter avec une erreur de moins de 10% le nombre de photons incident jusqu'à des flux de 10MHz environ. La figure (II.17.b) montre le bruit (déviations standard) sur ce décompte de photons en fonction du flux incident. On observe qu'à cause de la PPR finie, le bruit est inférieur à celui obtenu dans le cas où la PPR serait nulle. Cependant la variation relative du décompte pour une variation relative de 10% du flux incident consécutive à un potentiel d'action dans le neurone décroît également quand le flux incident augmente, (figure (II.17.c)). En conséquence, on observe sur la figure (II.17.d) que le rapport signal sur bruit croît moins vite en fonction du flux incident que si la PPR était nulle et qu'il sature pour les flux très élevés par rapport à $1/PPR$ à une valeur de $0,1 \cdot (T/PPR)^{1/2}$.

On voit dans cette figure que l'utilisation de 2 PMT de PPR de 20ns permet d'obtenir un rapport signal sur bruit proche de celui d'un système idéal (en comptage de photons et avec une PPR nulle), jusqu'à des flux de photons incidents de l'ordre de 10MHz. Par conséquent, notre montage permet de rendre optimale l'utilisation de ces PMT (*ie.* fonctionnement linéaire, non-limité par leur PPR) dans la gamme de flux moyen qu'ils peuvent tolérer. L'intérêt de multiplier le nombre de PMT est de toujours les utiliser dans ce régime linéaire et d'augmenter le flux maximal incident, qui est ensuite réparti sur chaque PMT. Avec 2 PMT, ceci correspond à un flux incident moyen de 10-12 MHz et avec 4 PMT de 20-24MHz. Notons que des flux incidents instantanés plus élevés se produisent (l'arrivée des photons est Poissonnienne). Dans ce cas, le rapport signal sur bruit continue à augmenter mais moins vite que pour le système idéal. Par conséquent, il

est idéal dans nos expériences de travailler à un flux moyen sur l'ensemble de l'image de 12MHz (avec 2 PMT) et de 24 MHz (4 PMT), ce qui est le flux moyen maximal tolérable par les PMT et qui correspond à un flux instantané plus élevé sur les somas des neurones. Sur les somas des neurones, le signal sur bruit sera affecté par la PPR (ce ne sera pas aussi bien qu'avec un PMT idéal), mais comme le rapport signal sur bruit continue à augmenter avec le flux incident, cette situation reste avantageuse. Notons que la documentation Hamamatsu ne dit pas précisément quelle est l'échelle de temps sur lequel un flux instantané supérieur à 6MHz par PMT devient dangereux...

Il est intéressant de comparer les performances de notre système à ce que nous aurions obtenu avec les PMT utilisés en mode analogique. Pour cela, j'ai utilisé la simulation numérique pour calculer le bruit (standard déviation) sur le décompte corrigé par l'Equation 2 : après avoir (i) simulé un train Poissonien tronqué par la PPR et (ii) calculé les décomptes pour chaque pas de temps, on utilise l'équation (II.2) pour transformer ces décomptes en décomptes réels estimés. Si l'on représente la standard déviation $\sigma_{\text{estimé}}$ de ces décomptes réels estimés, on observe qu'elle augmente avec le flux incident réel plus vite que le bruit de photons \sqrt{N} du PMT idéal: on voit dans cette représentation, que l'effet de la PPR est bien de rajouter du bruit (Figure II.18). Dans cette représentation, il est facile de comparer le bruit analogique que l'on aurait eu avec ce même PMT, qui est de l'ordre de $\sigma_{\text{analogique}}=1.57\sqrt{N}$ (Driscoll, Shih et al. 2011) (figure II.18). On voit que la supériorité du PMT analogique sur un système de 2 PMT en mode de comptage ne s'établira qu'au delà de 17MHz, et 38MHz pour le système à 4 PMT. Notons que le régime 24MHz–38MHz n'est pas accessible dans la configuration actuelle en comptage compte tenu de la fréquence maximale tolérée par les PMT qui est de 6MHz/PMT soit 24MHz pour 4 PMT. Il faudrait soit augmenter encore le nombre de PMT, soit jouer sur leur gain (voir discussion).

Enfin, ces simulations montrent que si l'on compte un flux de l'ordre de 10MHz sur nos deux PMT le rapport signal sur bruit, s'il est limité uniquement par le comptage de photons, devrait être de l'ordre de 4.5, ce qui est une situation favorable pour détecter des transitoires évoqués par un seul potentiel d'action.

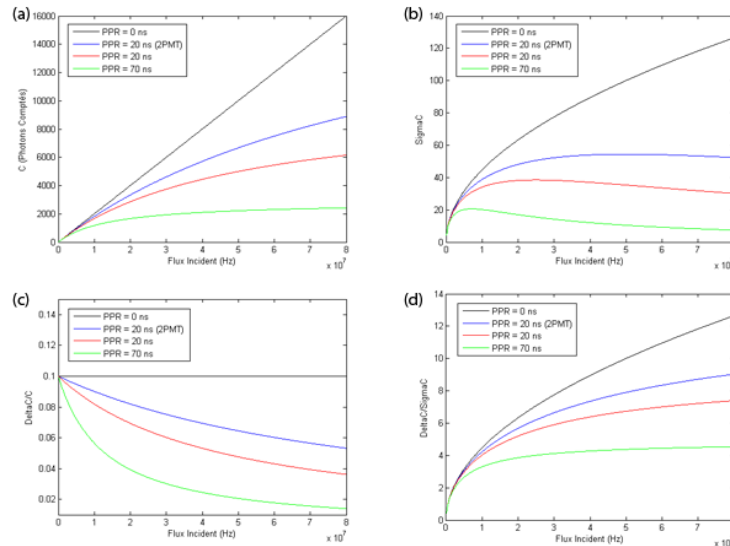


Figure II.17 : Effet de la PPR sur les décomptes des signaux de fluorescence.

Noir : 1 PMT de PPR=0ns, bleu : 2 PMT de PPR=20ns ; rouge : 1PMT de PPR=20 ns ; vert : 1 PMT standard (PPR=70ns). Les décomptes C sont calculés pour un temps $T=200 \mu s$ (temps typique d'intégration sur un neurone dans un champ de $150 \mu m$ enregistré à 20Hz).

(a) Décompte moyen C mesuré en fonction du flux incident réel ϕ .

(b) Bruit (déviatoin standard) σ_c du décompte C en fonction du flux incident réel ϕ .

(c) Variation relative du décompte $\Delta C/C$ due à une variation relative de 10% du flux incident réel, en fonction du flux incident réel ϕ .

(d) Rapport signal sur bruit $\Delta C/\sigma_c$ en fonction du flux incident réel ϕ .

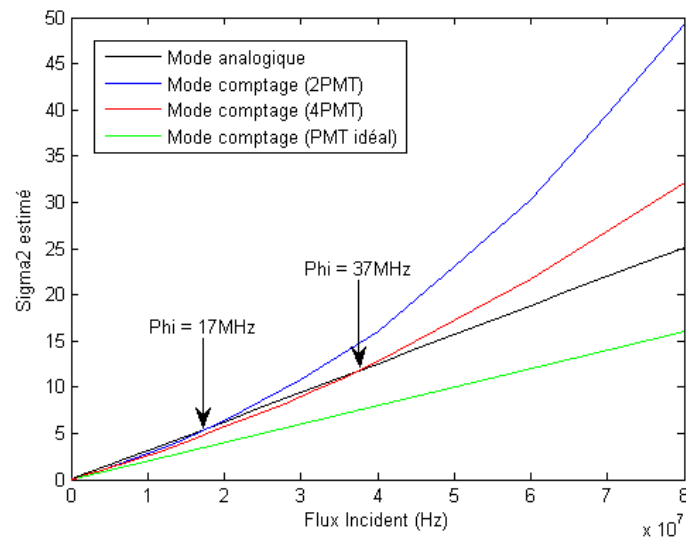


Figure II.18 : Comparaison du bruit mesuré avec un PMT H7421-40mod selon une utilisation analogique ou en comptage de photons avec une détection à 2 ou 4 PMT. Le bruit en comptage de photons est défini comme la standard déviatoin $\sigma_{estimé}$ du décompte réel estimé. Le bruit en analogique est donné par $\sigma_{analogique}=1.57\sqrt{N}$ (courbe noire). Le cas d'un PMT en comptage de photons idéal de PPR=0 est indiqué en vert.

II.3.2 Comparaison avec les expériences

Nous avons vérifié que seul le bruit de photons était présent au niveau de la détection de notre microscope sur divers échantillons *in vitro*.

Fluorescéine

Dans un premier temps le microscope a été testé sur un échantillon de fluorescéine où le champ est quasi uniformément fluorescent. Nous nous affranchissons ainsi d'éventuels problèmes liés à la ROI et à sa taille. Quelque soit le flux de photons incidents sur les PMT, le bruit présent sur les images correspond bien au bruit de photons (figure II.19).

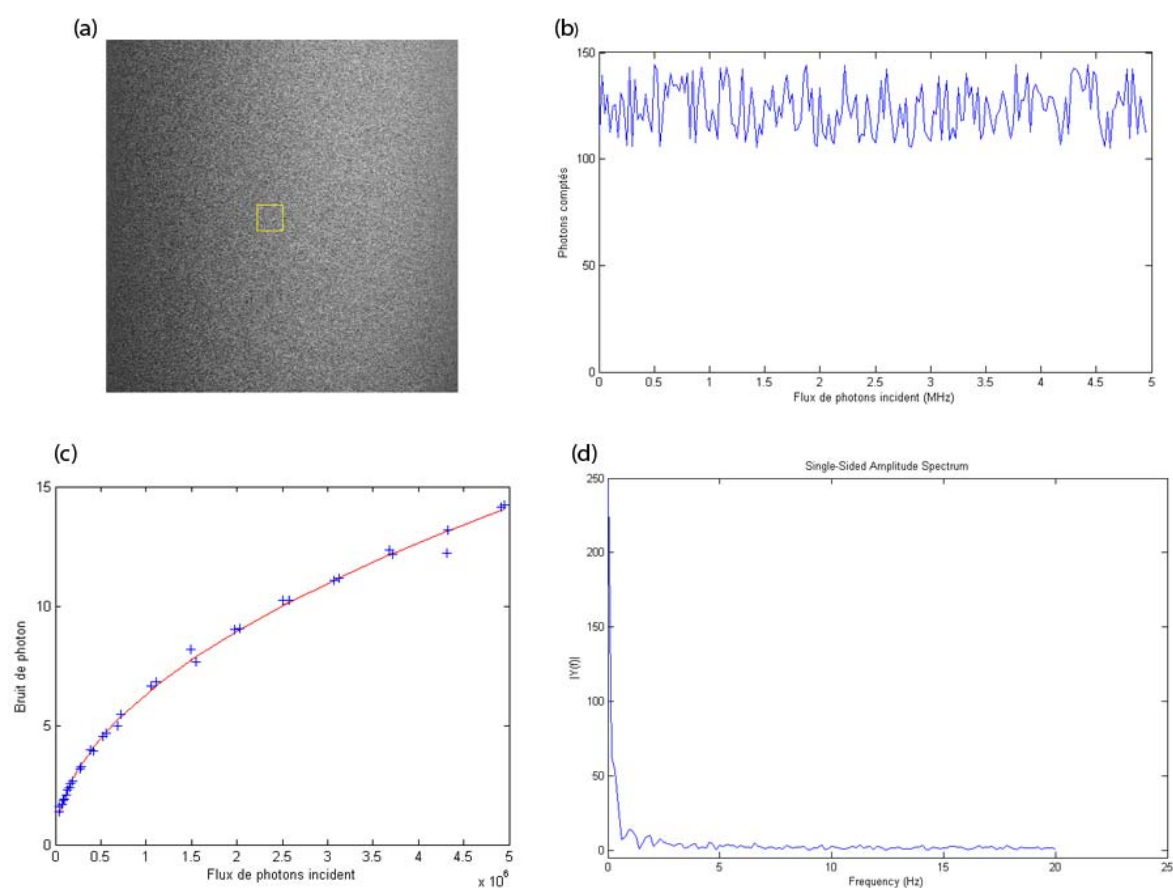


Figure II.19: Mesure du bruit sur un échantillon de fluorescéine

(a) Fluorescéine imagée à 40Hz sur un champ de $150\mu\text{m}$. La ROI utilisée pour mesurer le bruit est délimitée par le carré jaune (400 pixels).

(b) Tracé du nombre de photons comptés sur la ROI pendant 5 secondes.

(c) Bruit mesuré sur la ROI en fonction du flux de photons incidents sur les PMT. En bleu le bruit mesuré sur la ROI de 400 pixels, en rouge le bruit de photons théorique : $\sigma = \sqrt{N}$.

(d) Transformée de Fourier du signal présenté en (b). Le spectre ne présente aucune composante de bruit particulière.

Billes fluorescentes

Ensuite, nous avons testé notre microscope sur des billes fluorescentes de $10\mu\text{m}$ de diamètre. En effet, compte tenu de leur taille semblable à celle d'un neurone elles constituent un modèle idéal qui s'affranchit de tout bruit physiologique (respiration, rythme cardiaque...).

Les ROI ont été définies manuellement afin d'englober l'intégralité des billes tout en éliminant le contour (ROI circulaires). Le bruit mesuré sur les images de billes est lui aussi de l'ordre du bruit de photons quelque soit le flux de photons incidents sur les PMT (figure II.20). Ceci démontre, en comparaison de la fluorescéine, qu'il n'y a pas de bruit lié à des vibrations mécaniques.

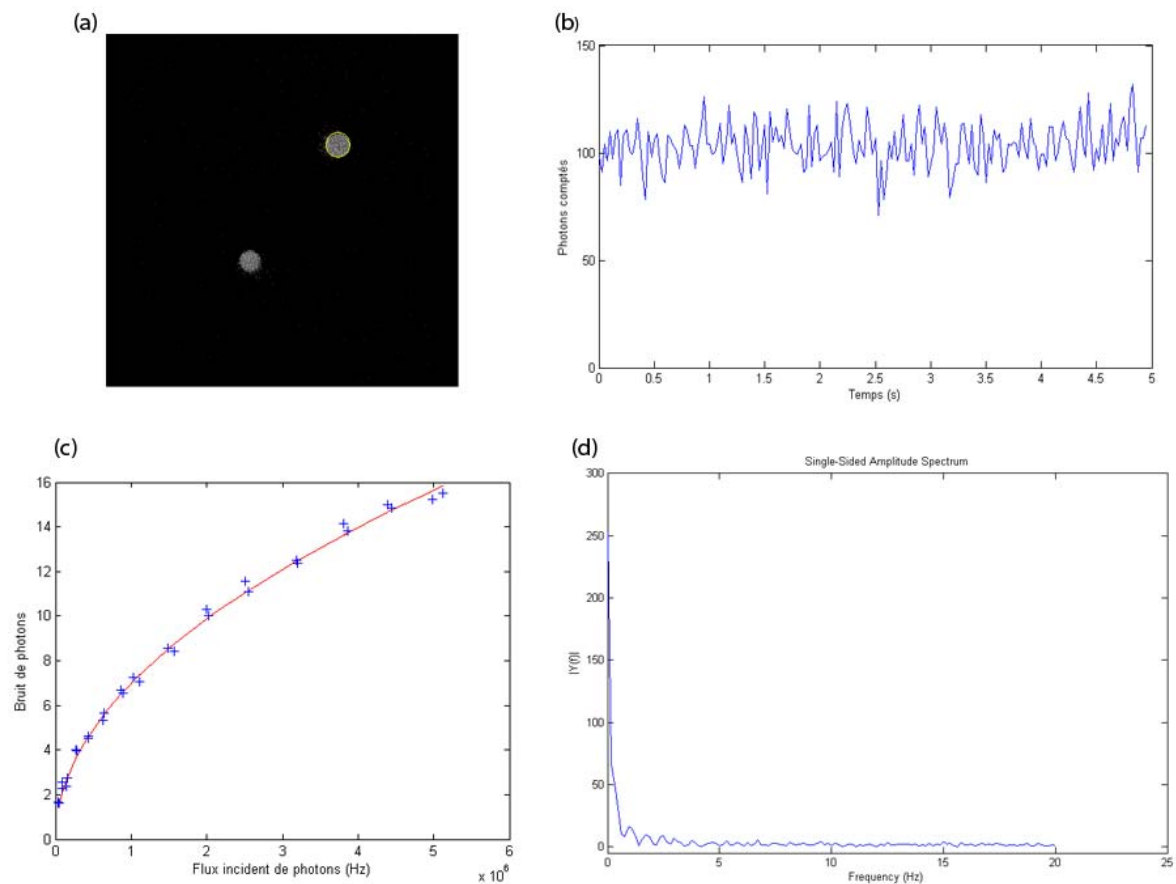


Figure II.20: Mesure du bruit sur des billes fluorescentes.

(a) Billes fluorescentes ($D=10\mu\text{m}$) imagées à 40 Hz sur un champ de $150\mu\text{m}$. La ROI utilisée pour mesurer le bruit est délimitée par le cercle jaune sur la bille du haut (489 pixels).

(b) Nombre de photons comptés sur la ROI représentée en (a) pendant 5 secondes.

(c) Bruit mesuré sur la ROI en fonction du flux de photon incident sur les PMT. En bleu le bruit mesuré sur la ROI de 489 pixels, en rouge le bruit de photons théorique : $\sigma=\sqrt{N}$.

(d) Transformée de Fourier du signal présenté en (b). Le spectre ne présente aucune composante de bruit particulière.

Quantification précise du bruit dans les expériences *in vivo*

Enfin, nous avons quantifié le bruit réel des signaux fluorescents enregistrés *in vivo* sur des neurones. Les premières analyses d'images enregistrées *in vivo* ont mis en évidence l'existence de bruits dus aux rythmes physiologiques de l'animal avec notamment une forte composante autour de 5Hz correspondant au rythme cardiaque du rat (figure II.22). En effet, la ROI étant fixe, si le neurone sort légèrement de celle-ci au cours du temps en raison de mouvements physiologiques ou de bruits mécaniques, le signal peut être fortement biaisé par ajout de pixels « noirs » et/ou perte de pixels « lumineux ».

Comme expliqué dans la partie méthode, ce bruit a été éliminé en corrigeant la position des images enregistrées en fonction du stack de référence enregistré au début de chaque expérience et fournissant une origine xyz pour chaque neurone (figures II.21 et II.22). Il résulte de cette opération un film d'activité intégralement recalé avec une précision spatiale de 1 μ m et une précision temporelle de 100ms (10Hz) par rapport au stack OG d'origine. Ce niveau de précision permet de détecter des mouvements 3D jusqu'à 10Hz ce qui inclut la respiration ($f \approx 1$ Hz) et le rythme cardiaque ($f \approx 5$ Hz) et donc de supprimer les artefacts qui en résultent sur le signal de fluorescence enregistré. La composante du bruit à la fréquence cardiaque est assez faible par rapport aux bruits basses fréquences (99,7% de la puissance spectrale du signal se trouve dans la bande de fréquence inférieure à 1Hz), mais l'analyse en transformée de Fourier du signal révèle qu'en moyenne le pic de bruit cardiaque à $f = 5.7\text{Hz} \pm 0.1\text{Hz}$ correspond à une amplitude de l'ordre de 10 photons par rapport à un signal total de l'ordre de 700 photons (figures II.22). Or l'amplitude d'un transitoire calcique évoqué par un potentiel d'action individuel étant de 10% par rapport au signal total, cela correspond donc à 70 photons. Le bruit cardiaque peut donc induire des erreurs de près de 15% (10/70) sur la mesure d'un transitoire.

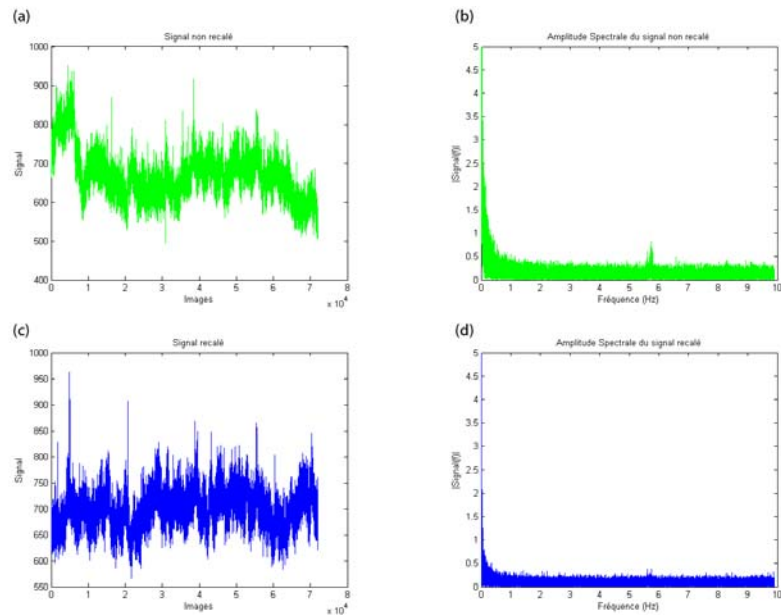


Figure II.21 : Stabilisation numérique des images après correction des mouvements.

(a) Signal de fluorescence enregistré à 20Hz sur un neurone non repositionné par rapport au stack de référence.

(b) Densité de puissance spectrale du signal de fluorescence (a). On observe la présence d'un pic autour de la fréquence $5.7\text{Hz} \pm 0.1\text{Hz}$, cette fréquence est typiquement celle du rythme cardiaque de l'animal (confirmé par l'ECG).

(c) Signal de fluorescence enregistré à 20Hz sur le même neurone que (a) mais repositionné par rapport au stack de référence.

(d) Densité de puissance spectrale du signal de fluorescence (c). Le pic autour de la fréquence 5.7Hz a disparu et le bruit basse fréquence a diminué en amplitude.

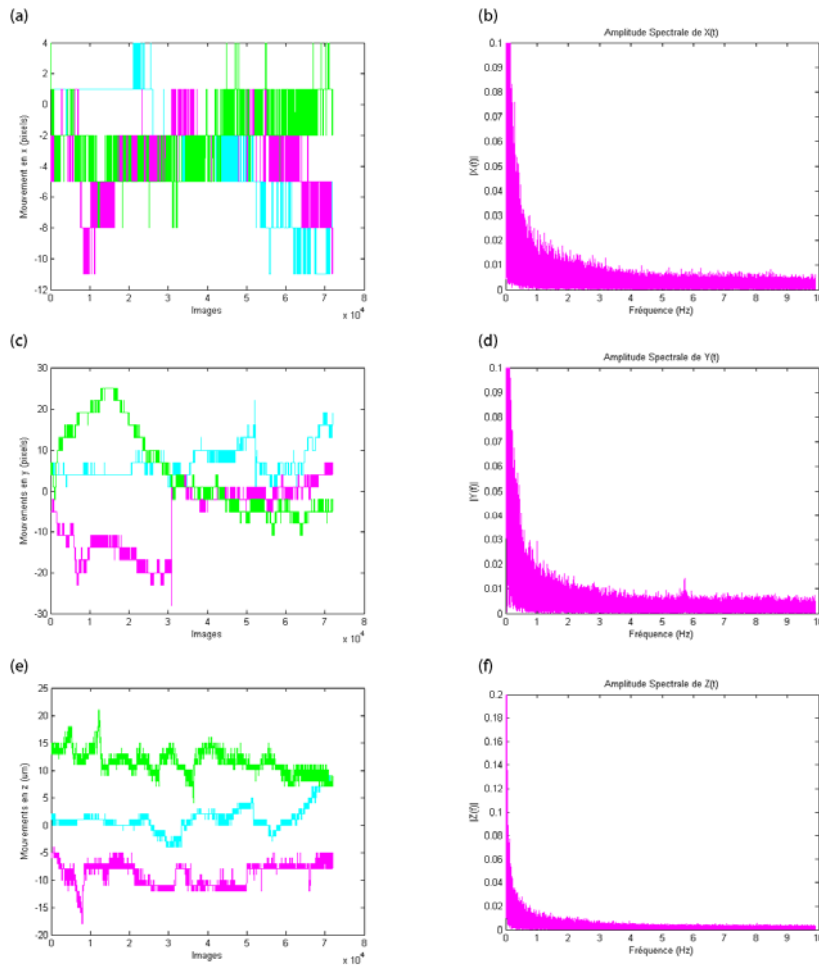


Figure II.22 : Repositionnement des images : mouvements xyz. Les courbes roses sont relatives au neurone présenté en figure II.21

(a) Mouvements de corrections des images autour de la position de référence suivant la direction x (rostro-caudale) au court du temps pour 3 enregistrements différents. L'unité de ce recalage est le pixel soit $1 \text{ pixel} = 0.375 \mu\text{m}$. La valeur moyenne du recalage suivant x est de $3 \text{ pixels} \pm 1 \text{ pixel}$.

(b) Densité de puissance spectrale du mouvement de recalage suivant x pour le neurone présenté en figure II.21.

(c) Mouvements de corrections des images autour de la position de référence suivant la direction y (média-latérale) au court du temps pour 3 enregistrements différents. L'unité de ce recalage est le pixel soit $1 \text{ pixel} = 0.375 \mu\text{m}$. La valeur moyenne du recalage suivant y est de $8 \text{ pixels} \pm 4 \text{ pixels}$.

(d) Densité de puissance spectrale du mouvement de recalage suivant y pour le neurone présenté en figure II.21. On note la présence d'un pic autour de la fréquence $5.7 \text{ Hz} \pm 0.1 \text{ Hz}$.

(e) Mouvements de corrections des images autour de la position de référence en μm suivant la direction z au court du temps pour 3 enregistrements différents. La valeur moyenne du recalage suivant z est de $3 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$.

(f) Densité de puissance spectrale du mouvement de recalage suivant z pour le neurone présenté en figure II.21.

Par ailleurs, ce recalage traite également les évènements de bruits isolés (figure II.23) ainsi que les éventuelles dérives en z du plan d'imagerie au cours des 80 minutes d'enregistrement assurant ainsi une identification précise des neurones étudiés.

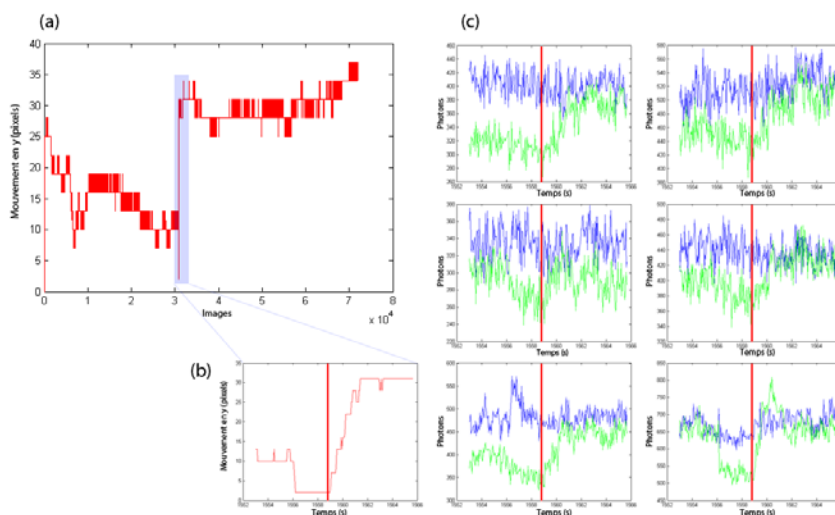


Figure II.23 : Effet du recalage des images sur un évènement de bruit rapide et ses conséquences sur le signal de fluorescence.

(a) Mouvement de correction suivant y pour un enregistrement. La zone bleutée correspond à un évènement de bruit rapide et de grande amplitude (environ 20 pixels).

(b) Représentation plus résolue de la zone bleutée présentée en (a)

(c) Signaux de fluorescence enregistrés sur six neurones différents lors de l'enregistrement. En bleu, le signal recalé, en vert le signal sans recalage, le trait rouge marque le moment où le bruit se produit. On remarquera qu'il correspond également au moment où apparaît un bruit sur le signal non recalé.

A l'issue de ce traitement post enregistrement, seul le bruit de photons subsiste sur les images corrigées (figure II.24).

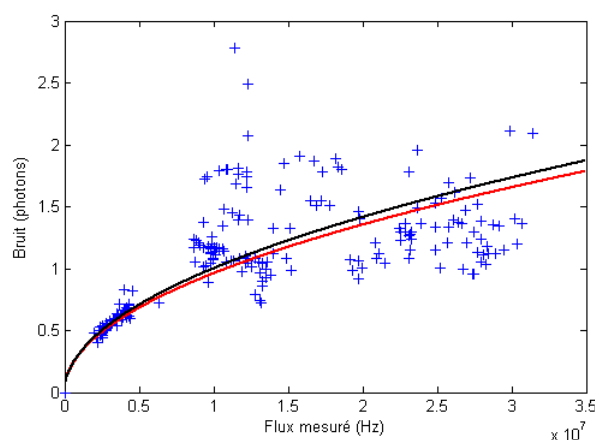


Figure II.24 : Comparaison entre le bruit mesuré sur les images recalées et le bruit de photons théorique.

En bleu le bruit mesuré par pixel en fonction du flux de photon réel mesuré après recalage en xyz pour des neurones enregistrés sur 8 expériences, en rouge le fit correspondant, en noir le bruit de photons théorique \sqrt{N} est tracé. Le bruit est mesuré en retirant les moments où l'on observe des transitoires.

II.3.3 Photo blanchiment

La microscopie à deux photons utilisant une source laser pulsée pour exciter les sondes calciques, une quantité d'énergie non négligeable est transmise au tissu entraînant la création de radicaux libres responsables d'une détérioration tant de la cellule que des sondes fluorescentes elles-mêmes. Il faut donc être très attentif à limiter cet effet dans la mesure du possible afin d'éviter le photo blanchiment. Pour effectuer des enregistrements longs (typiquement 80 minutes) nous avons porté attention à minimiser au maximum la puissance laser transmise au niveau du cortex tout en gardant un bon niveau de signal. Généralement une puissance de 25mW était appliquée en sortie d'objectif en début d'expérience (profondeur d'imagerie $\approx 100\mu\text{m}$) puis celle-ci était progressivement augmentée au fur et à mesure des enregistrements pour garder une amplitude de fluorescence collectée constante à une profondeur donnée. Cependant, sur 80 minutes d'enregistrement, à puissance d'excitation constante, le niveau de fluorescence collectée avec la détection à deux PMT ne diminue que d'environ 18% en moyenne (figure II.25) ce qui laisse un niveau de signal très suffisant en fin d'expérience. Dans le cas de la détection à quatre PMT, bien qu'il y ait une nette augmentation du flux de photons et de la puissance laser nécessaire, le photo blanchiment demeure raisonnable : 16,5% de perte sur le signal de fluorescence en soixante minutes d'enregistrement (figure II.25).

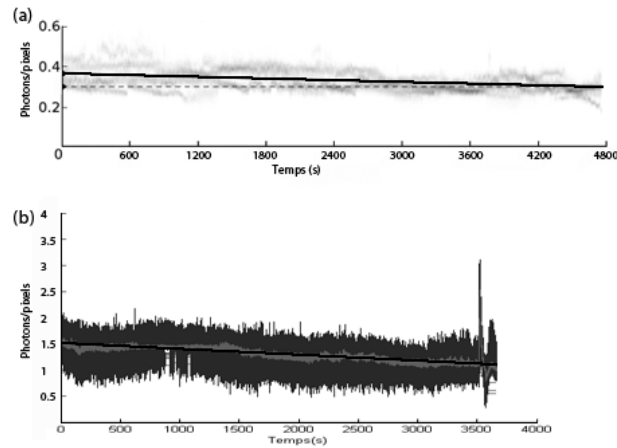


Figure II.25 : Effet du photo blanchiment pour la détection à deux et quatre PMT
 (a) Détection à deux PMT ($\lambda_{laser}=900nm$) : nombre de photons moyen comptés par pixel de ROI et enregistré à 40Hz pendant 80 minutes (flux moyen de photons total: 4MHz) sur cinq expériences différentes (en gris clair). La courbe noire correspond à un fit exponentiel, la ligne pointillée correspond au nombre de photons comptés en fin d'enregistrement. En moyenne, la perte de fluorescence après 80 minutes d'enregistrement est de 18,6%.
 (b) Détection à quatre PMT ($\lambda_{laser}=920nm$) : nombre de photons moyen comptés par pixel de ROI et enregistré à 40Hz pendant 60 minutes (flux moyen de photons total : 20MHz). En gris foncé, le niveau de fluorescence normalisé au cours du temps pour 16 ROI ; en gris clair, le niveau de fluorescence normalisé moyen pour ces 16 ROI ; en noir, le fit exponentiel correspondant. En une heure, le niveau moyen de fluorescence a chuté de 16.5%.

II.3.4 Transitoires calciques

Dans les conditions expérimentales décrites, c'est-à-dire pour des flux de photons moyens égaux au flux moyen maximum toléré par les PMT et en utilisant notre système de recalage des mouvements artéfactuels, nous avons analysé les transitoires calciques évoqués par des potentiels d'action. En particulier, nous voulons savoir si des transitoires évoqués par des potentiels d'action individuels sont détectables et d'autre part quelle fraction du signal enregistré sur le soma des neurones est en fait reliée à l'activité dans le neuropil, en conséquence de l'étendue de la PSF du microscope. Il a été démontré en effet que les signaux calciques présents dans le neuropil reflétaient l'activité des axones présents dans la zone dont beaucoup fournissent les entrées aux neurones observés sur les champs enregistrés (Kerr, Greenberg et al. 2005). Ces signaux dans le neuropil produisent eux aussi des transitoires dont la forme ressemble beaucoup à celle des transitoires des neurones. En cas de contamination optique des neurones par le neuropil qui les entoure, il y a potentiellement un risque de confusion entre ces deux types de transitoires et il serait souhaitable d'obtenir une estimation de ce risque. Ce type d'étude pourrait être faite en combinant sur quelques cellules l'enregistrement électrophysiologique en configuration cellule attachée des potentiels d'action des neurones et l'enregistrement des transitoires calciques dans les mêmes neurones. Ce type d'expérience n'a pas pu être mené et nous avons analysé uniquement les traces calciques.

L'observation des traces calciques (figure II.26) montre la présence d'événements dont la forme et l'amplitude sont typiques de transitoires évoqués par des potentiels d'action. Ces événements sont détectables avec un excellent rapport signal sur bruit sur des enregistrements à 40Hz, des champs de 150 μ m de côtés et avec une détection à 4 PMT. On voit en particulier :

- des événements dont l'amplitude est de l'ordre de 10% correspondant vraisemblablement à des potentiels d'action individuels (figure II.27).

- des événements d'amplitude plus grande que 10% correspondant à des potentiels d'action multiples dans une fenêtre de temps courte pendant la montée du transitoire calcique (figure II.27).

D'autre part, pour estimer l'existence d'une contamination du signal somatique par le neuropil, on peut observer dans les traces calciques des événements présents dans le neuropil mais non observés dans le soma des neurones voisins et des événements présents dans le soma des neurones mais absents du neuropil (figure II.28). Ceci indique très vraisemblablement une faible contamination du signal somatique.

Afin de quantifier cet effet, nous avons utilisé la méthode développée par l'équipe de Kerr (Mittmann, Wallace et al. 2011). Après avoir exclu des traces 1s d'enregistrement autour des transitoires calciques détectés visuellement (car au moment de ces transitoires une corrélation entre l'activité neuronale et du neuropil immédiatement voisin est vraisemblable), nous avons calculé le coefficient de régression linéaire entre les signaux au soma et les signaux du neuropil voisin (après avoir normalisé les signaux à une moyenne de 0 et à une standard déviation de 1) (figure II.29). Cette mesure permet d'obtenir une estimation de la part de l'amplitude des fluctuations de $\Delta F/F$ du signal neuronal qui est directement relié aux fluctuations du signal du neuropil. Pour N=40 neurones, ce taux de contamination moyen q est de 0.74% ce qui demeure faible par rapport à une transitoire calcique de 10%.

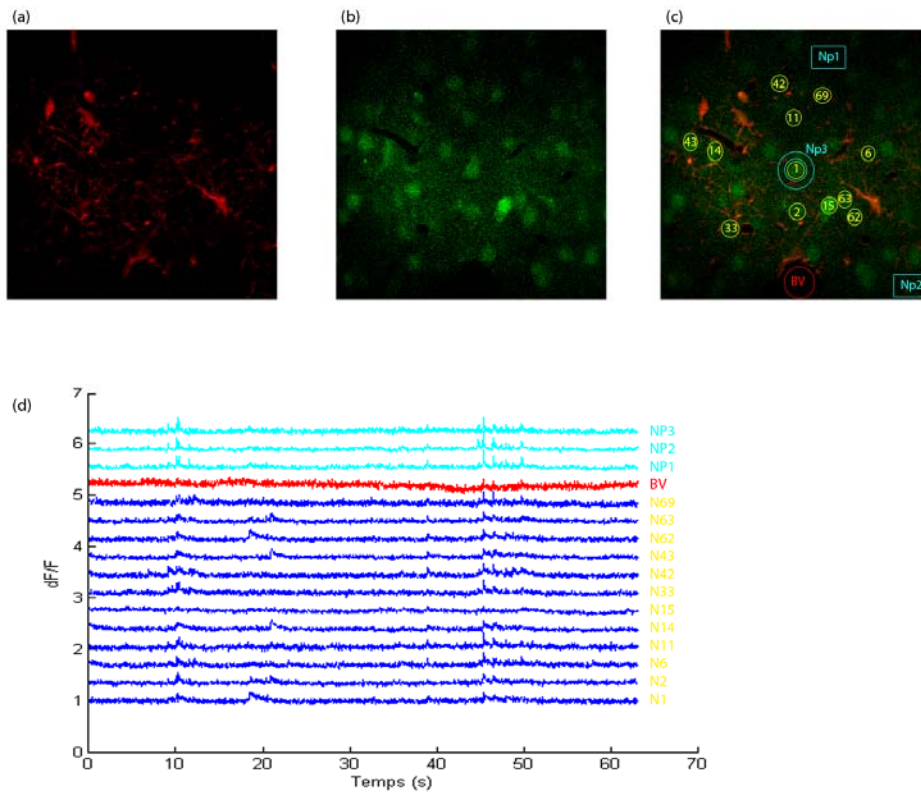


Figure II.26 : Détection de transitoires individuels
 (a) Image du marquage Sulforhodamine d'un champ de 150µm côté.
 (b) Image du marquage Oregon Green sur le même champ.
 (c) Superposition de (a) et (b) avec en jaune les ROI correspondant aux neurones enregistrés, en rouge la ROI correspondant à un vaisseau sanguin (contrôle 1), en cyan deux ROI correspondant au neuropil en deux lieux différents du champ (contrôle 2).
 (d) Signaux de fluorescence ($\Delta F/F$) des ROI définies en (c) enregistrés à 20Hz. On observe le signal du neuropil (qui dépend peu du lieu d'enregistrement sur le champ) et l'absence de signal particulier sur la ROI correspondant au vaisseau sanguin.

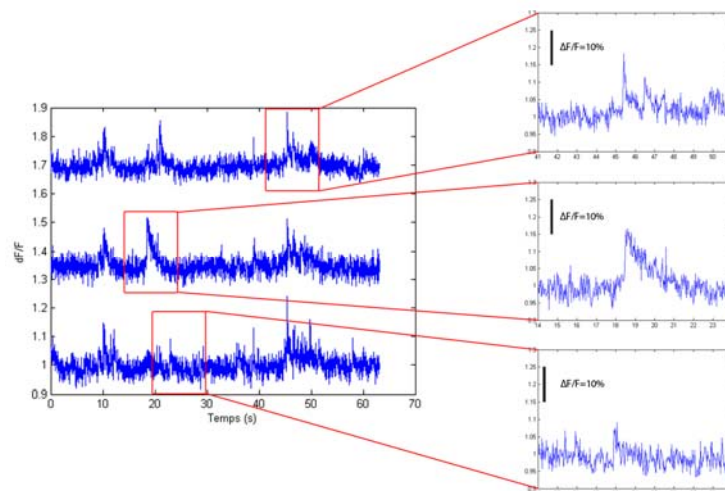


Figure II.27 : Discrimination des transitoires calciques
 Signaux de fluorescence enregistrés à 20Hz pour trois neurones.
 De bas en haut, les traces calciques correspondent à des transitoires calciques générés par respectivement 1, 2 et 3 potentiels d'action successifs (estimé à partir de l'amplitude de $\Delta F/F$)

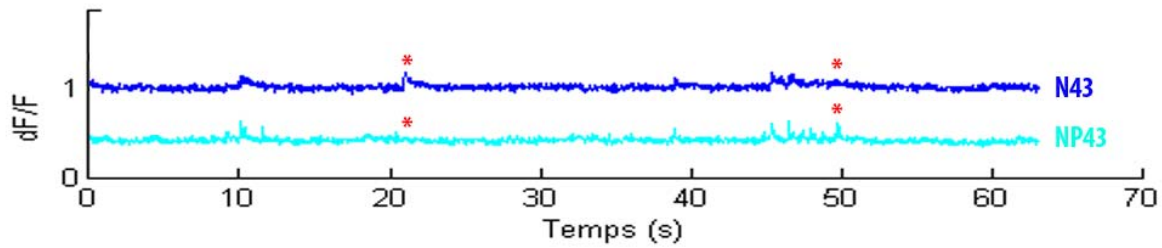


Figure II.28 : Contamination par le neuropil.
 En bleu le $\Delta F/F$ enregistré sur un neurone, en cyan le $\Delta F/F$ enregistré simultanément sur le neuropil autour du neurone en question. Les étoiles rouge montre des évènements présents sur le signal du neurone et absents sur celui du neuropil et inversement.

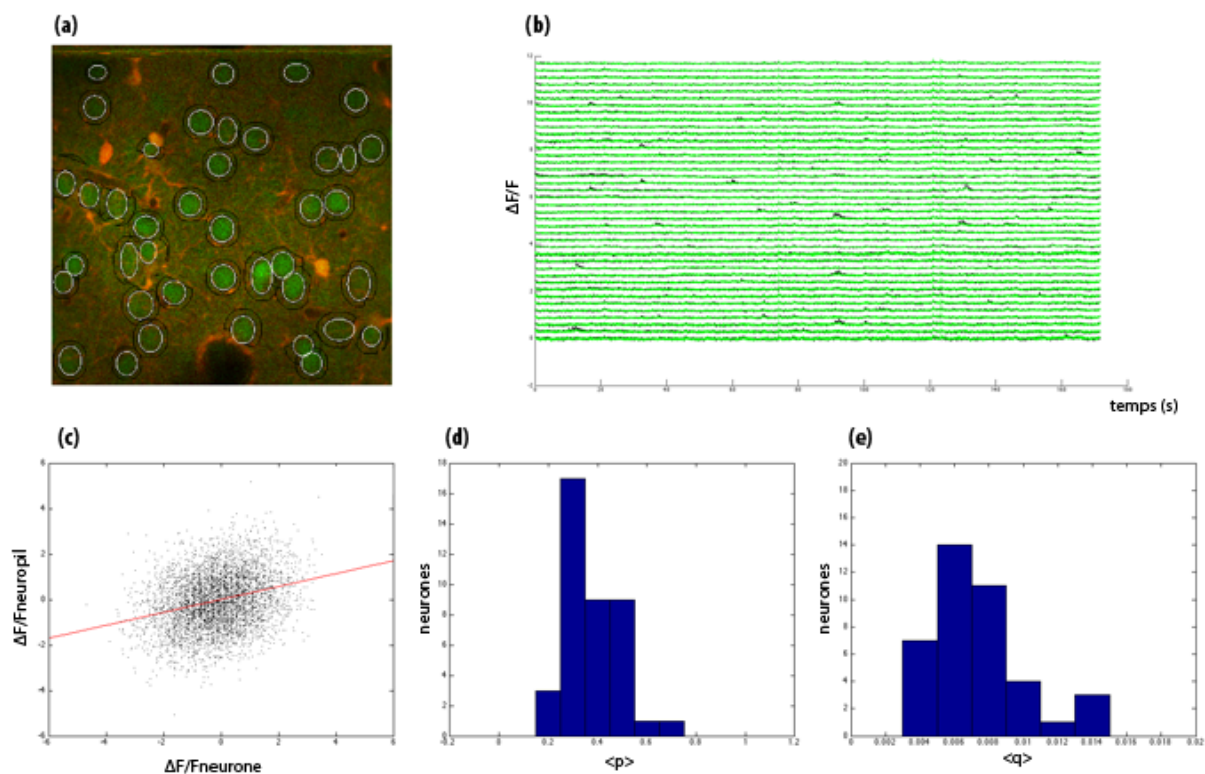


Figure II.29 : Quantification de la contamination par le neuropil.
 (a) Champ imagé (OGB1+SR101) avec les ROI définissant les neurones (en blanc) et le neuropil autour de chaque neurone (en noir)
 (b) Traces calcique $\Delta F/F$ enregistrée pendant 3 minutes sur $N=40$ neurones(en noir) et leur neuropil à proximité (en vert). L'enregistrement est choisi sur une période durant laquelle aucun mouvement XYZ ne se produit.
 (c) Pour un couple (neurone+neuropil), tracé (en noir) de $\Delta F/F$ du neuropil en fonction de $\Delta F/F$ du neurone. Les $\Delta F/F$ sont normalisés ($m=0$, $std=1$). En rouge, le fit linéaire de pente p correspondant.
 (d) Histogramme représentant les p obtenues pour les 40 neurones présentés en (b). $\langle p \rangle = 0.37$, $std(p) = 0.11$.
 (e) Histogramme représentant la contamination par le neuropil évaluée à la valeur $q = p \cdot std(\Delta F/F)$ pour chaque neurone ($N=40$). $q = 0.74\% \pm 0.04\%$

II.4. Discussion

II.4.1 Le microscope

Au cours de ce doctorat nous avons construit un montage de microscopie à deux photons innovant optimisé pour mesurer le signal de fluorescence de transitoires calciques :

- - Le système de balayage basé sur l'utilisation d'un miroir résonnant permet l'enregistrement rapide d'images sur des champs larges (jusqu'à $700\mu\text{m}$) avec une bonne résolution temporelle (de 20 à 80Hz).
- - Le système optique de collection a été optimisé pour collecter le plus efficacement possible les photons de fluorescence émis maximisant ainsi le rapport signal à bruit.
- - Les résolutions axiales et latérales ont été quantifiées ($\text{FWHM}_z=3.5\mu\text{m} \pm 0.5\mu\text{m}$ et $\text{FWHM}_{xy}=0.8\mu\text{m} \pm 0.05\mu\text{m}$) et permettent pleinement la résolution de corps cellulaires.
- - Les PMT sont utilisés en comptage de photon réduisant ainsi le bruit au bruit de photons. L'effet de la PPR sur les mesures a également été caractérisé en détail.
- - Une collection sur 4PMT du signal calcique OGB1 a été réalisée à l'aide d'une ligne fibrée permettant ainsi la détection d'évènements individuels.
- - Un outil de visualisation en temps réel des images acquises a été implémenté.

Le choix d'utiliser 4 PMT en mode comptage de photon plutôt qu'un PMT en mode analogique se justifie par le fait que ce dernier cas ne devient meilleur en termes de rapport signal à bruit qu'au delà d'un flux incident de photons de 38MHz (figure II.19). Le régime 10MHz –17MHz n'étant pas accessible dans la configuration initiale en comptage (2 PMT) une solution a été d'augmenter le nombre de PMT. Une autre solution pourrait être de diminuer leur gain, la seule contrainte étant de ne pas dépasser un courant moyen d'anode équivalent au maximum toléré par le PMT, à savoir $2\mu\text{A}$. Cette solution n'a pas été explorée pendant ma thèse car les PMT dont nous disposions se présentaient sous forme de modules de comptage « préréglés » ne donnant pas accès au réglage de leur gain.

Concernant le balayage, l'intérêt d'un scanner résonnant par rapport à un scanner galvanométrique classique réside uniquement dans sa vitesse. En effet, notre scanner résonnant CRS-series oscille à près de 8kHz (7,91kHz), là où un scanner classique M-series atteint péniblement les 2kHz. Ce facteur 4 dans la vitesse de balayage est crucial dans l'optique de résoudre temporellement des évènements courts tels que des transitoires calciques. On peut noter qu'en raison de contraintes mécaniques, les scanners résonnants sont généralement plus petits que leurs homologues galvanométriques mais leur taille ($6\times 4\text{mm}$ pour le CRS-series, angle de balayage $\alpha=15^\circ$) est amplement suffisante pour balayer un faisceau laser tel que le nôtre.

Pour obtenir une résolution temporelle de l'ordre de la ms, la technique de scan point par point à l'aide de déflecteurs acousto-optique (AOD) permet d'effectuer des enregistrements très rapides (0,1 à 1 kHz) avec un rapport signal à bruit élevé. En effet, cette technique permet de passer rapidement d'une ROI (neurone) à l'autre sans perdre de temps à scanner les zones sans intérêts. Cependant les artefacts de mouvement deviennent problématiques avec cette approche dès lors que leur mesure et leur correction ne peuvent être effectuées en absence d'images. En conséquence, compte tenu des mouvements inhérents à une expérimentation *in vivo*, cette technique devient moins intéressante dès lors qu'elle n'est pas associée à une technique permettant de corriger activement (en temps réel) les mouvements dans le plan ainsi que les mouvements axiaux (en dehors du plan).

Enfin, l'effet du photo blanchiment est critique lorsqu'il s'agit d'enregistrements longs tels que les nôtres. En l'occurrence une technique de réalisation d'image par balayage limite l'excitation du milieu biologique dans la mesure où le faisceau laser n'est pas constamment appliqué sur les ROI puisqu'il scanne une image complète. Par ailleurs, nous avons remarqué un effet critique de la longueur d'onde utilisée pour l'excitation ; cet effet est actuellement en cours de caractérisation.

II.4.2 Signaux enregistrés

La détection de potentiels d'action individuels reste difficile dans les enregistrements *in vivo*. Nous n'avons pas développé d'algorithme permettant de transformer la trace calcique en événements discrets, car nous avons estimé que dans la plupart des expériences de ma thèse le rapport signal sur bruit était trop juste pour pouvoir identifier de façon certaine les potentiels d'action. Nous avons donc choisi de traiter dans la partie 3 nos enregistrements avec une étude en PSTH des traces de fluorescences, ce qui a pour effet de moyennier le bruit de photons tout en conservant l'information des transitoires faiblement résolus.

A la fin de mon travail de thèse et en particulier grâce à l'implémentation de la détection à 4PMT, la qualité des enregistrements s'est considérablement améliorée et il paraît évident que les signaux obtenus pourront à terme être déconvolués sous forme de trains de potentiels d'action. Il reste à démontrer le taux de fidélité de cette opération et la précision temporelle obtenue sur le train de potentiels d'action, et le couplage de l'imagerie à l'électrophysiologie sera indispensable pour cette étape.

Un aspect important de la détection des transitoires individuels est donc leur résolution temporelle afin de déterminer au mieux le temps auquel ont eu lieu les potentiels d'action. Le temps de montée d'un transitoire calcique évoqué par un seul spike est de l'ordre de 10 à 20 ms (50ms au maximum). En échantillonnant le signal à 20Hz (cas le plus fréquent), nous pouvons détecter les événements au mieux à 50ms près. Cependant en enregistrant les images à 80Hz il est tout à fait possible de réduire ce temps à 12,5ms ce qui améliore d'un facteur 4 la résolution temporelle de l'évènement. En

revanche, afin de garder un bon rapport signal à bruit, la taille du champ imagé devra vraisemblablement être réduite.

Par ailleurs, l'algorithme de recalage des images par rapport au stack de référence est un processus très intéressant afin de limiter les bruits dus entre autres aux mouvements physiologiques tels que la respiration ou le rythme cardiaque. Dans l'optique d'effectuer des enregistrements sur animal éveillé, cet outil s'avèrerait particulièrement utile. De plus, nos signaux sont très faiblement contaminés par le neuropil ce qui s'explique vraisemblablement par le fait qu'ayant porté attention à conserver une ouverture numérique de 0.7 en excitation nous obtenons un petit volume focal et donc peu de contamination.

Enfin, nous avons montré que le photo blanchiment n'était pas problématique y compris sur des expériences de longue durée. Notons que celui-ci semble particulièrement sensible à la longueur d'onde d'excitation. Cet effet entre photo blanchiment et longueur d'onde sera rediscuté dans la partie suivante.

III. Intégration multi vibrissale

III.1. Introduction

III.1.1 Espace des phases 2D des stimulations préférentielles (filtres linéaires)

Mon travail de thèse a été considérablement impacté par les résultats des récents travaux de Estebanez et El Boustani (Estebanez, Boustani et al. 2012) qui ont étudié en détail l'espace spatio temporel des stimulations vibrissales induisant une réponse neuronale au niveau du cortex à tonneaux. A l'aide d'une matrice de stimulation permettant de stimuler uni directionnellement (direction rostro caudale) l'ensemble des 24 vibrisses les plus caudales, ils ont appliqué des profils de stimulations de type « bruit gaussien » non corrélé entre celles-ci, tout en enregistrant simultanément en électrophysiologie extracellulaire plusieurs cellules du cortex à tonneaux. A partir d'un modèle « LN » (Linéaire/Non linéaire) ils ont décrit la fonction de transfert entre stimuli et réponse neuronale en potentiels d'action.

En stimulant de manière décorrélée avec un bruit gaussien l'ensemble des vibrisses d'un côté du museau et en effectuant une analyse en corrélation inverse à partir des réponses neuronales induites, ils ont notamment mis en évidence l'existence de stimulations types induisant une activité neuronale (figure III.1). Dans un premier temps, ils définissent l'ensemble des stimuli engendrant une réponse significative, puis ils décomposent cet ensemble en vecteurs (analyse en composantes principales) agissant comme des filtres linéaires. Ensuite, à partir de cet espace, ils définissent une seconde fonction non linéaire qui donne le taux de décharge du neurone en fonction des composantes du stimulus. Les deux vecteurs principaux V1 et V2 sont responsables à eux seuls de 73% de la variance de l'activité enregistrée (figure III.1.c). V2 étant la transformée de Hilbert de V1, ces deux vecteurs sont déphasés de 90° (figure III.). Chaque stimulation peut être projetée dans l'espace 2D défini par V1 et V2, (figure III.1.e). Dans ce sous-espace, la distance au centre définit la qualité de la décomposition, de telle sorte qu'un point du cercle unitaire est une combinaison linéaire parfaite de V1 et V2. Décomposées ainsi, la plupart des stimulations produisant une réponse significative se situent à proximité du cercle unitaire validant la décomposition suivant la base (V1, V2).

Compte tenu de ces résultats récents et de ma collaboration avec Luc Estebanez, j'ai choisi d'utiliser ces vecteurs V1 et V2 comme stimulations lors de mes enregistrements en microscopie à deux photons (voir plus loin).

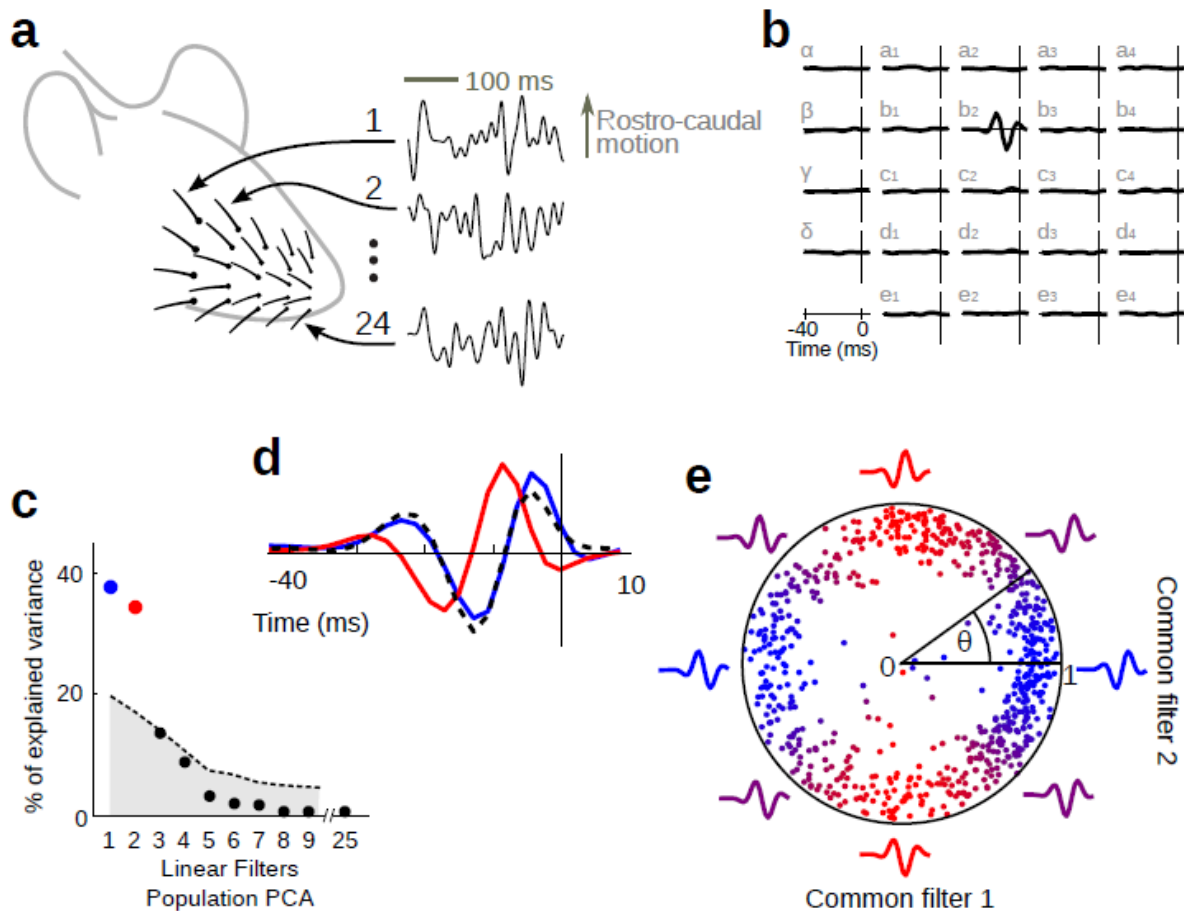


Figure III.1 : Espace des phases dans lequel sont encodées les stimulations tactiles (Estebanez, Boustani et al. 2012)

(a) Un bruit Gaussien est appliqué de manière décorrélée suivant la direction rostro caudale aux 24 vibrisses situées à droite du museau.

(b) Exemple d'un filtre linéaire significatif montrant le déplacement temporel d'une vibrisse induisant une réponse sur un neurone monovibrissal obtenue en utilisant une analyse STC (spike triggered covariance).

(c) Analyse en composantes principales (PCA) appliqué à l'ensemble des filtres linéaires obtenus pour tous les neurones mono vibrissaux (680 filtres). Deux valeurs propres principales expliquent à elles seules 73% de la variance (points bleu et rouge).

(d) Les filtres propres ($V1$ et $V2$) correspondant aux deux valeurs propres principales. En pointillé la transformée de Hilbert du filtre rouge.

(e) Représentation normalisée de tous les filtres significatifs de tous les neurones issus de l'ensemble des expériences, projetée sur le sous espace des stimulations défini par les filtres ($V1, V2$). La distance au centre donne l'amplitude de la décomposition linéaire de chaque filtre dans la base ($V1, V2$).

III.1.2 Sélectivité à la phase : codage de vitesse et/ou de position

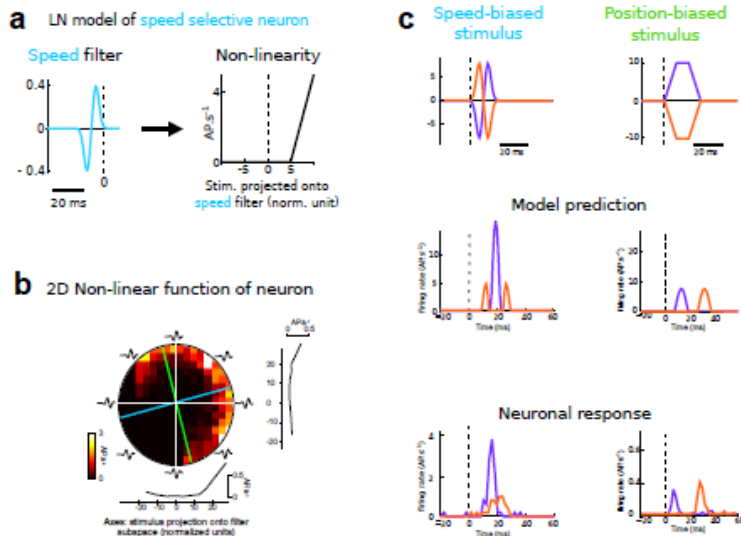
L'espace défini par V1 et V2 peut également être interprété comme un espace de vitesses et de position. En effet, V1 est comparable à un filtre sensible à la vitesse de déflexion tandis que V2 serait un filtre plutôt unidirectionnel et donc sensible à la position (sens de déflexion). En effet, si on s'arrête sur la forme de V1, celle-ci possède un biais conséquent en vitesse pour une position moyenne quasi nulle. En revanche, V2 présente une vitesse moyenne quasi nulle mais un biais conséquent en position.

Estebanez et al. ont ainsi testé ce modèle sur plusieurs neurones et ont ainsi démontré que certaines cellules répondaient fortement à une stimulation biaisée en vitesse et peu voire pas pour une stimulation biaisée en position ou suivant la vitesse opposée (figure III.2). Il existe d'ailleurs une très grande similitude entre la réponse neuronale et la prédiction du modèle LN pour un neurone sélectif à la vitesse.

De même, ils ont démontré que d'autres neurones répondaient fortement à une stimulation biaisée en position et peu voire pas pour des stimulations biaisées en vitesse ou suivant la position opposée (figure III.2). Il existe dans ce cas aussi une très grande similitude entre la réponse neuronale et la prédiction du modèle LN pour un neurone sélectif à la position.

Cependant, aucune information (excepté une étude de densité en fonction des couches) n'a jusqu'ici été fournie sur l'organisation spatiale de ces neurones au sein de la colonne corticale. Or il serait intéressant de savoir comment sont situées ces cellules et si des cartes de sélectivité en direction et/ou en vitesse apparaissent au sein d'une colonne corticale. Je me suis donc intéressé dans mon travail de thèse à cette organisation en couches II/III en enregistrant en microscopie à deux photons des champs larges comprenant de nombreux neurones tout en stimulant l'ensemble des vibrisses à l'aide des vecteurs V1 et V2.

Speed-selective neuron



Position-selective neuron

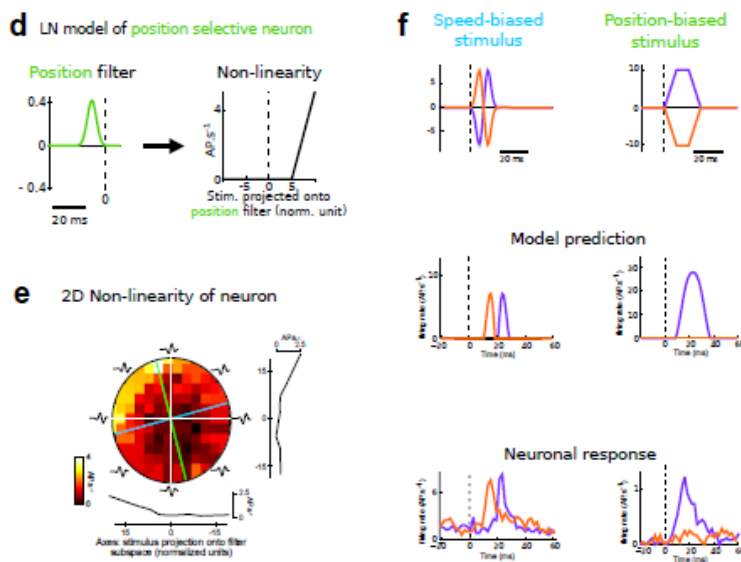


Figure III.2 : Sélectivité en vitesse et position dans l'espace des phases (Estebanez et al., 2012).

(a) Modèle LN pour un neurone sélectif à la vitesse.

(b) Fonction non linéaire 2D d'un neurone dont la sensibilité est proche de l'axe sélectif à la vitesse (axe bleu).

(c) En haut: Stimuli biaisés en vitesse (à gauche) et en position (à droite) sont appliqué au modèle LN d'un neurone sélectif à la vitesse (au milieu) et au neurone représenté en (b) (en bas).

(d) Modèle LN pour un neurone sélectif à la position.

(e) Fonction non linéaire 2D d'un neurone dont la sensibilité est proche de l'axe sélectif à la position (axe vert).

(f) Idem que (c) pour le modèle de (d) et le neurone de (e).

III.1.3 Différentiation entre sélectivité à la phase et sélectivité à la direction

La sensibilité à la phase vue précédemment pourrait être une représentation différente de la sélectivité à la direction telle qu'elle a été classiquement étudiée au laboratoire jusqu'ici. Cependant, Estebanez et al. ont démontré que ces deux sélectivités (sélectivité à la phase et sélectivité à la direction) étaient distinctes l'une de l'autre. En effet, pour des neurones sensibles aux déflexions de la vibrisse C2 ils ont comparé les deux sélectivités (figure III.3). Dans ce travail, la sélectivité à la phase est mesurée en utilisant les filtres décrits précédemment, mais la sélectivité directionnelle est étudiée en appliquant des déflexions classiques utilisées dans le domaine pour étudier cette sélectivité : des formes du type Diracs qui mélange a priori les contributions des deux filtres. L'intérêt de cette approche était de montrer que la sélectivité à la phase était bien une nouvelle sélectivité par rapport à la sélectivité directionnelle classiquement étudiée. Il n'apparaît effectivement aucune corrélation notable entre l'angle préférentiel défini pour la direction de la stimulation et celui défini pour la phase (figure III.3). D'un point de vue fonctionnel, ces deux sélectivités semblent donc complémentaires et non nécessairement liées.

Il est cependant intéressant d'étudier ce lien entre phase et direction en utilisant comme stimuli élémentaire pour les deux sélectivités les filtres optimaux V1 et V2. En effet, l'existence potentielle de liens entre les deux sélectivités pourra être interprétée de façon simple uniquement dans ce cas. D'autre part, mon travail en microscopie à deux photons permettra d'étendre le travail d'Estebanez et al. à la couche II/III, lieu d'une forte intégration multi vibrissale. Enfin, notre étude peut permettre d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale des neurones et l'existence d'éventuelles cartographies fonctionnelles pour chaque sélectivité et comment celles-ci sont éventuellement positionnées les unes par rapport aux autres.

Dans mon travail de thèse, je me suis donc appliqué à étudier l'effet du paramètre direction sur la sélectivité à la phase et inversement, l'effet du paramètre phase sur la sélectivité à la direction. J'ai donc dans un premier temps étudié comment des cellules sensibles à la phase modifiaient leur comportement en fonction de la direction suivant laquelle était appliquée cette phase. Ensuite, j'ai étudié comment des neurones sensibles à la direction se comportaient suivant la phase appliquée à leur direction propre.

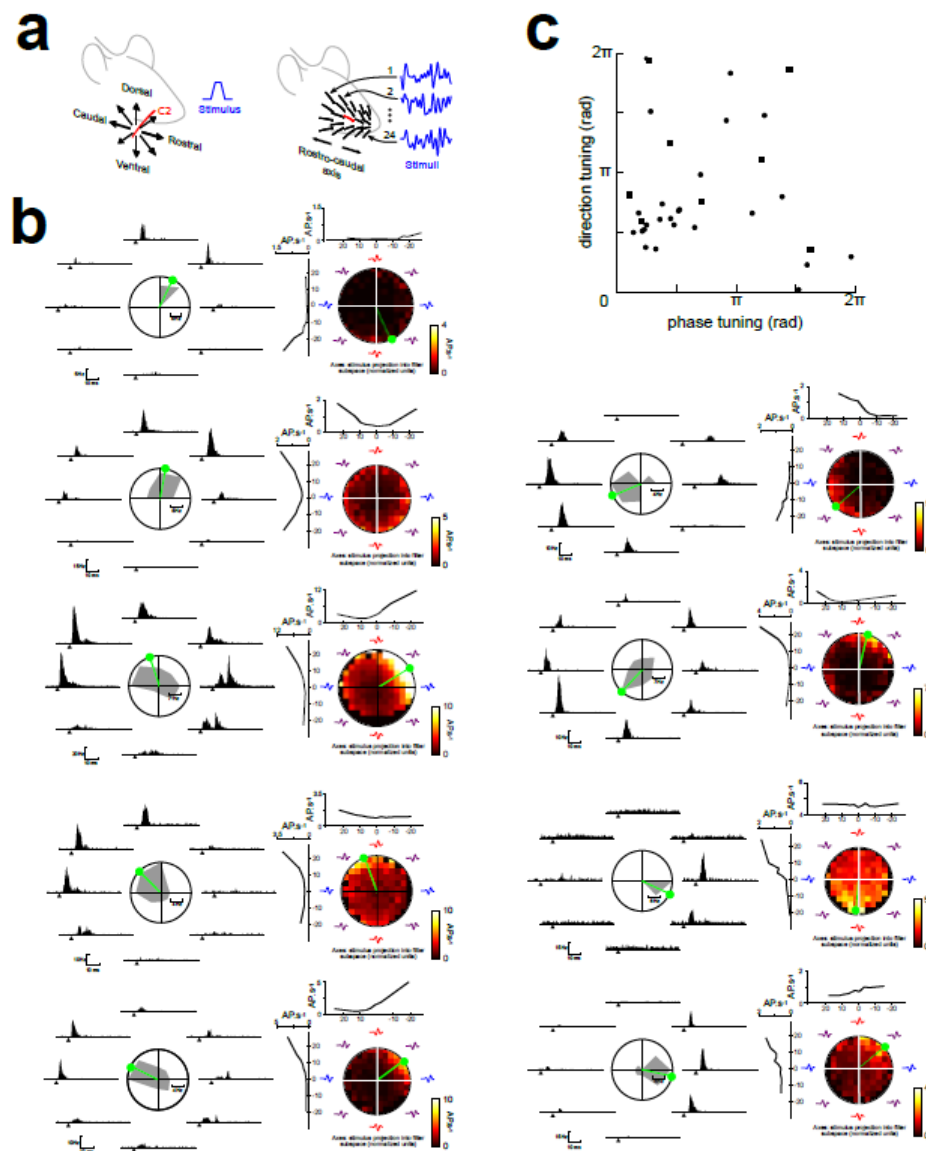


Figure III.3 : La sensibilité à la phase ne dérive pas de la sensibilité à la direction (Estebanez et al. 2012).

(a) à gauche: la sensibilité à la direction est testée en appliquant des Diracs de stimulation suivant 8 directions (caudo-rostrale, rostro-caudale, dorso-ventrale, ventro-dorsale et les quatre directions intermédiaires) sur la vibrisse C2. À droite : des bruits blancs indépendants ont été appliqués aux 24 vibrisses afin d'enregistrer la sensibilité à la phase des neurones répondant pour les déflexions de C2.

(b) Sensibilité à la phase et à la direction de 9 neurones ayant une réponse directionnelle forte à la déflexion de la vibrisse C2. Pour chaque neurone: à gauche la sensibilité à la direction, avec en marge les PSTH obtenus pour chaque direction et à droite la sensibilité à la phase (fonction non linéaire dans l'espace des phases). En vert sont représentés les vecteurs moyens de sensibilité pour la direction et pour la phase.

(c) Diagramme représentant l'angle préférentiel pour la direction en fonction de celui pour la phase pour 33 neurones. Les cellules représentées en (b) sont représentées par les carrés. Les points sont diffus et aucun cluster n'apparaît (coefficient de corrélation: -0.065).

III.1.4 Effet de la corrélation multi vibrissale : caractère local ou global des neurones

Estebanez et al. ont également étudié l'effet de la corrélation entre les stimulations des différentes vibrisses sur les réponses neuronales. Ils ont ainsi procédé à l'enregistrement extra cellulaire de l'activité du cortex à tonneaux en faisant varier le niveau de corrélation centre les stimulations des 24 différentes vibrisses entre zéro et un ($c=0, 0.25, 0.5, 0.75$ et 1) (figure III.4.a). Ainsi, chaque stimulation est composée d'un bruit Gaussien commun et d'un bruit Gaussien propre dont la somme est pondérée en fonction du niveau de corrélation : pour $c=0$, seul le bruit propre est présent pour la vibrisse considérée tandis que pour $c=1$ seul le bruit commun est appliqué à toutes les vibrisses.

Certains neurones dont l'activité est faible à un niveau de corrélation nulle deviennent de plus en plus actifs lorsque le niveau de corrélation augmente (figure III.4.c). De telles cellules sont appelées « globales » puisqu'elles répondent préférentiellement à une stimulation appliquée globalement à l'ensemble des vibrisses. A l'opposé, d'autres cellules dites « locales » sont particulièrement actives pour des stimulations d'une seule vibrisse de manière totalement décorrélée et montrent une réponse en général plus faible dès que le niveau de corrélation augmente (figure III.4.e). Sur la figure III.4 le niveau de corrélation variant de 0 à 1 par pas de 0.25, le nombre de potentiels d'actions de la cellule globale représentée varie ainsi: 9815, 10148, 10694, 10863, 11089 potentiels d'actions. De même, pour la cellule locale représentée le nombre de potentiels d'action prend les valeurs suivantes en fonction de la corrélation croissante des stimulations : 2317, 1968, 1787, 1363, 1040 potentiels d'action.

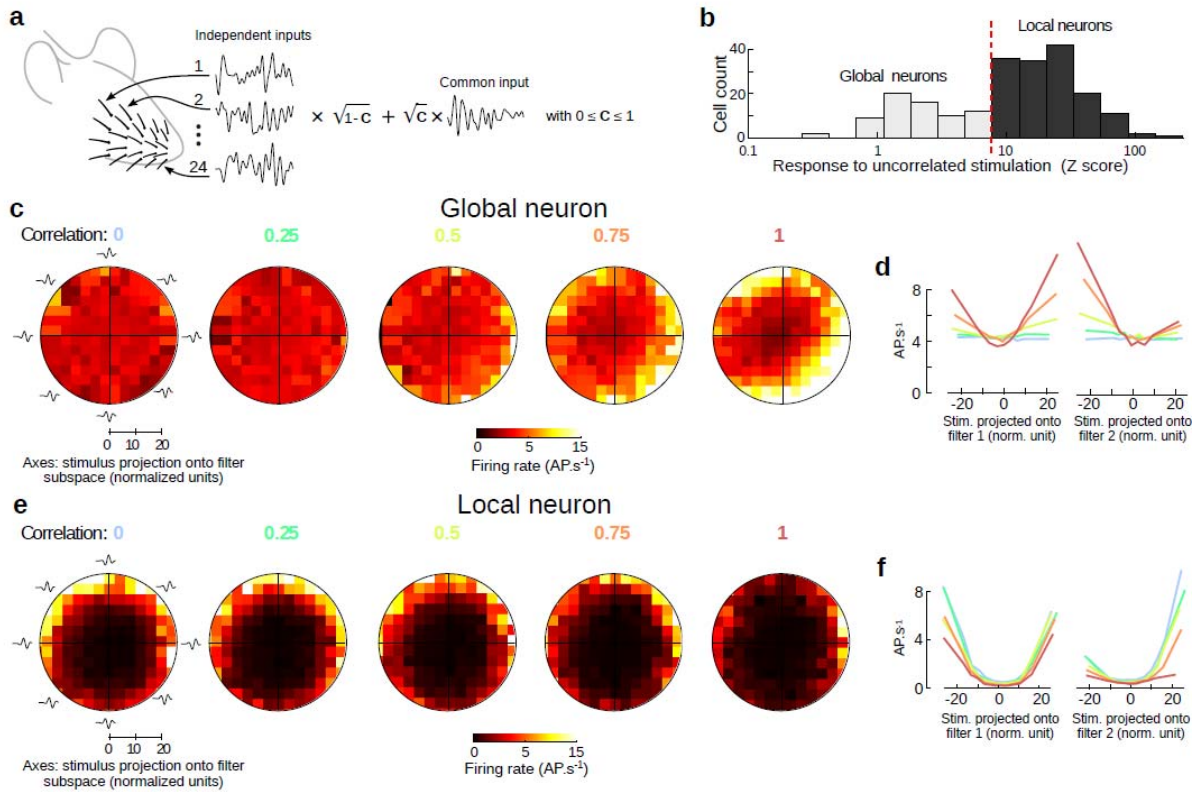


Figure III.4 : Les fonctions non linéaires des neurones dépendent du niveau de corrélation entre les stimulations des différentes vibrisses (Estebanez et al. 2012).

(a) Niveau de corrélation des stimulations. Les stimuli des différentes vibrisses sont construits avec un facteur de corrélation c : ils sont obtenus par sommation pondérée de deux bruits Gaussien, l'un commun, l'autre propre à chaque vibrisse.

(b) Distribution des Z-scores bimodaux obtenus par stimulations corrélées ou décorréliées définissant le caractère local (noir) ou global (gris) des neurones ($N=222$). La ligne pointillée rouge définit le seuil de significativité à 1%.

(c) Fonction non linéaire d'une cellule globale de la couche V, pour cinq niveaux croissant de corrélation entre les stimulations vibrissales (du bleu au rouge).

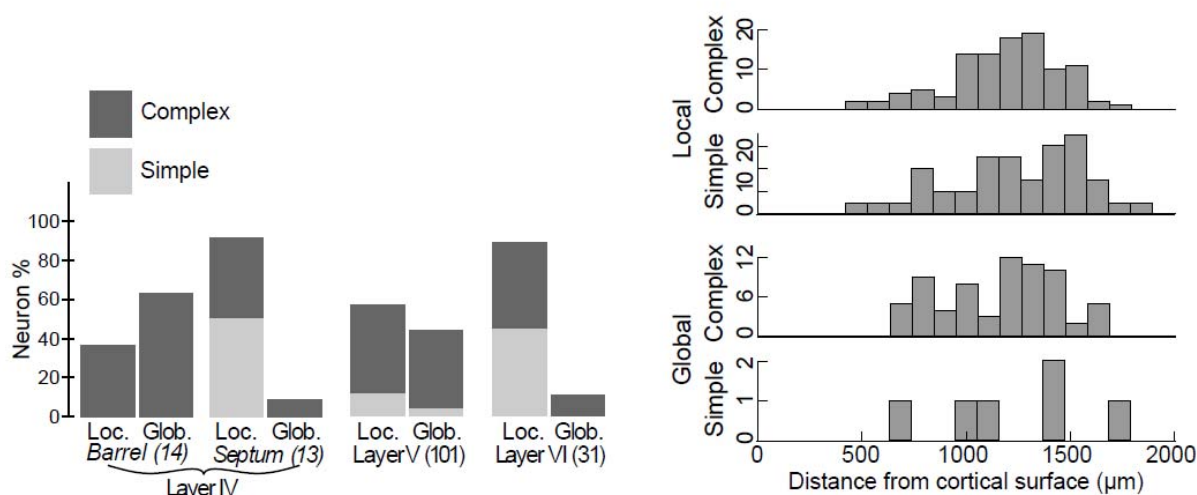
(d) Fonctions non linéaires marginales pour les différents niveaux de corrélation suivant les vecteurs $V1$ (à gauche) et $V2$ (à droite).

(e-f) Idem que a-b pour une cellule locale de la couche V.

III.1.5 Répartition et organisation spatiale des différents types de neurones

Le caractère global ou local des neurones semblent corrélé à leur position tant verticale (couche) que latérale (septum/tonneau). L'étude d'Estebanez et al. fournit une répartition des cellules en fonction de leur position (couche et distance à la surface) (figure III.5). En couche VI ils observent une majorité de cellules locales tandis que la proportion s'équilibre en couche V (56% de locales contre 44% de globales). En couche IV, les cellules globales sont très présentes dans les tonneaux et assez peu dans les septa où ils n'observent quasiment que des cellules locales. Par ailleurs, compte tenu de la difficulté à stabiliser les enregistrements électrophysiologiques à faible profondeur ils n'ont pas d'information sur la couche II/III bien que celle-ci soit un lieu important de l'intégration multi vibrissale.

Dans mon travail, je me suis donc intéressé à l'organisation spatiale des cellules globales et locales en couches II/III et en particulier à leur répartition entre septum et tonneau. En effet, il existe une forte connectivité horizontale en couches 2/3 et nous sommes demandés si les cellules situées dans les septa à des positions relativement symétriques entre 2 ou 3 barrels et celles situées au sein des tonneaux, montrent des réponses similaires ou distinctes pour des stimulations corrélés et décorrélés.



III.2. Méthode

III.2.1 Chirurgie

Les chirurgies ont été opérées suivant le protocole expliqué dans la partie précédente (cf. partie II.) et 11 rats de 12 à 18 semaines ont été utilisés dans cette étude.

III.2.2 Microscopie

Toute la microscopie a été effectuée avec le microscope dont le fonctionnement a été détaillé dans la partie précédente (cf. partie II.).

Dans un premier temps, les expériences ont été faites avec le système de détection à 2 PMT sur des champs de 150 μm de côté, enregistrés à 40Hz (400x400 pixels après linéarisation). Dans un second temps, les expériences ont été réalisées avec notre nouveau système de détection à 4 PMT sur des champs de 300 μm de côté. Dans les deux cas, le flux moyen par PMT était inférieur à la limite maximale qu'ils tolèrent. Le régime de flux moyen choisi à 2 PMT était de 5 MHz, soit 2.5 MHz par PMT ; le régime de flux moyen choisi à 4 PMT était de 24 MHz soit 6 MHz par PMT ; dans les deux cas, le flux moyen par PMT était bien inférieur à 6 MHz évitant l'endommagement des PMT. Le flux typique par neurone avec le système à 2 PMT était de l'ordre de 8 MHz en moyenne, avec des variations typiques entre 6 et 10 MHz en fonction du marquage des neurones, c'est-à-dire que les PMT restaient dans la gamme du régime linéaire de leur fonctionnement sur les neurones (déviations de la linéarité $< 10\%$). Avec le système à 4 PMT utilisé pour les enregistrements de champs de 300x300 μm , le flux typique par neurones étaient 4 fois plus élevé pour compenser la diminution du temps de pause sur chaque neurone d'un facteur 4. Il était donc de l'ordre de 32 MHz par neurone, variant typiquement entre 25 et 40 MHz. L'impact sur la non-linéarité des PMT restait limité puisqu'à 32 MHz par neurone, chaque PMT compte 8 MHz et s'écarte de 13.8% seulement du fonctionnement linéaire.

Toutes les expériences ont été faites entre 900 et 920nm.

III.2.3 Analyse des signaux calciques

Afin de tracer les signaux de fluorescence, les images sont corrigées des mouvements parasites suivant la méthode expliquée en partie II. Les enregistrements sont analysés en calculant les PSTH (peri stimulus time histogram) des traces de fluorescences (ceci permet entre autre de moyenniser le bruit de photons tout en conservant l'information des transitoires de faible amplitude dû à un potentiel d'action).

Pour chaque ROI correspondant à un neurone, la variation relative $\Delta F/F$ du nombre de photons $F(t)$ comptés au cours du temps est calculée comme

$$\frac{\Delta F}{F}(t) = \frac{F(t) - F_0(t)}{F_0(t)} \quad (\text{Eq. III.1})$$

où la ligne de base $F_0(t)$ est définie comme la convolution de $F(t)$ avec un vecteur constant de 1024 points. Pour nous affranchir d'éventuels artefacts, les variations de très grande amplitude du signal correspondant à des $\Delta F/F$ supérieurs à 100% sont écartées (en incluant une marge de 500 images).

Pour analyser les réponses fonctionnelles, la valeur moyenne $\frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)$ du signal $\Delta F/F(t)$ sur tous les essais identiques et synchronisée sur la stimulation (« stimulus triggered average ») est calculée sur une fenêtre de -0.5 s, +1 s autour de la stimulation.

Pour calculer les Z scores d'une réponse, la moyenne $\frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)_{random}$ d'une distribution aléatoire de $\Delta F/F(t)$ obtenue par tirage au hasard (« random triggered average ») dans le signal $\Delta F/F(t)$ est calculée. Le Z score est défini comme la différence entre les moyennes sur les 250 ms suivant le stimulus de $\frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)$ et de $\frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)_{random}$, normalisé par la déviation standard de la distribution aléatoire de $\Delta F/F(t)$:

$$\text{Zscore} = \frac{\langle \frac{\overline{\Delta F}}{F}(t) \rangle_{0-250\text{ms}} - \langle \frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)_{random} \rangle_{0-250\text{ms}}}{STD(\langle \frac{\overline{\Delta F}}{F}(t)_{random} \rangle_{0-250\text{ms}})} \quad (\text{Eq. III.2})$$

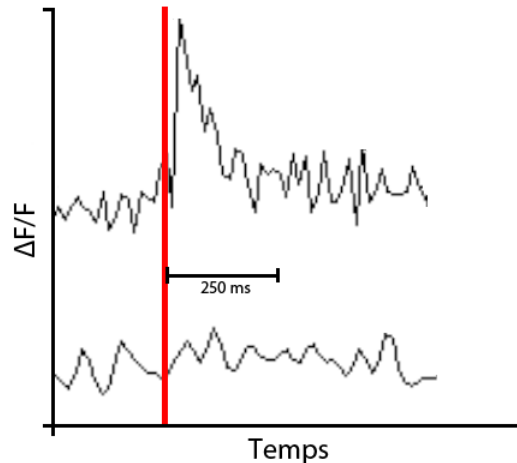


Figure III.6 : Quantification des réponses.

La variation relative du signal de fluorescence est calculée en moyennant les essais identiques synchronisés sur la stimulation (marquée en rouge) (en haut). La moyenne d'une distribution aléatoire de trace de fluorescence relative est obtenue par tirage au hasard de traces de même durée dans l'échantillon (en bas). Les signaux sont ensuite intégrés sur les 250 ms après le stimulus pour calculer le Z score associé à cette condition de stimulation.

Les angles préférentiels pour les sélectivités à la phase et à la direction sont définis de la manière suivante (voir figures III.19 et III.20) :

- L'angle directionnel préférentiel pour la phase i vaut :

$$\theta_i = \tan^{-1} \frac{Z(\varphi_i)_{CD} - Z(\varphi_i)_{DC}}{Z(\varphi_i)_{VD} - Z(\varphi_i)_{DV}} \quad (\text{Eq. III.3})$$

Avec CR, RC, DV et VD, les directions caudo-rostrale, rostro-caudale, dorso-ventrale et ventro-dorsale.

- La phase préférentielle pour une orientation suivant l'axe X :

$$\varphi_X = \tan^{-1} \frac{Z(\theta_X)_{\varphi_1} - Z(\theta_X)_{-\varphi_1}}{Z(\theta_X)_{\varphi_2} - Z(\theta_X)_{-\varphi_2}} \quad (\text{Eq. III.4})$$

III.2.4 Stimulations

Matrice de stimulation

Avec l'aide de Luc Estebanez, j'ai intégré une matrice de stimulation sous le microscope à deux photons afin de pouvoir stimuler simultanément les 24 vibrisses du rat lors des enregistrements. Cette matrice de stimulation est une réplique modifiée de celle utilisée à l'UNIC dans l'équipe de Daniel Shulz. Les pièces mécaniques ont été élaborées à l'atelier de mécanique de l'UNIC (Gif sur Yvette) et la partie électronique (commande, alimentation, contrôle) a été entièrement réalisée au laboratoire à l'ENS avec l'aide de Gérard Paresys (figure III.7).

La matrice se compose de cinq bras articulés (un bras par rangée de vibrisses) comportant chacun cinq stylets mécaniques (seulement quatre pour le bras inférieur) sur lesquels sont montés des stimulateurs piézoélectriques 2D Noliac®. A l'extrémité de chaque transducteur est fixé un tube métallique permettant d'y insérer la vibrisse sans appliquer de contrainte au repos. Les stylets mécaniques permettent d'ajuster la position de l'embout en fonction de la disposition des vibrisses via une liaison angulaire 2D et sont fixés sur des platines de translation 1D afin d'ajuster la position de l'extrémité du stimulateur suivant son axe (figure III.8). Chaque transducteur est fixé sur un ensemble masselotte/élastomère qui permet de l'isoler mécaniquement du reste de la matrice et de contrôler la fonction de transfert du système qui a été parfaitement caractérisée (figure III.9). Les vibrisses sont coupées à 1cm et insérées sur 5mm dans le tube du stimulateur. Lorsque le stimulateur est au repos, aucune contrainte n'est appliquée sur la vibrisse, celle-ci demeurant dans sa position naturelle sous anesthésie.

Deux principales modifications ont été apportées par rapport à la matrice originale. Premièrement, les 24 stimulateurs sont tous équipés de transducteurs piézoélectriques 2D permettant d'exploiter toutes les directions de stimulations. Auparavant les transducteurs étant 1D (à l'exception du transducteur central C2), la matrice ne permettait que l'exploration de la direction rostro-caudal. La seconde modification a été l'inclinaison à 45° de l'ensemble de la matrice. En effet, afin d'imager correctement la colonne corticale il est nécessaire de sectionner optiquement celle-ci parallèlement à la surface du cortex. Compte tenu de la position stéréotaxique de S1bf, il

est donc nécessaire de placer le rat à 45° par rapport à son axe dorso-ventral. Les vibrisses se trouvant en conséquence elles aussi à 45° par rapport à la normale, il a fallu repositionner l'ensemble de la matrice sur un bras à 45° tout en conservant ses propriétés mécaniques.

Par ailleurs, le microscope étant fixe, les changements de champ observé suivant XY se faisant par mouvement du rat, il a fallu fixer l'ensemble (matrice/support de l'animal) sur une platine de translation XY Luigs et Neumann présentant une précision micrométrique et surtout capable de supporter le poids de l'ensemble.



Figure III.7 : Matrice de stimulation implémentée sur le microscope à 2 photons
 A gauche, matrice de stimulation incorporée au microscope à deux photons.
 A droite, zoom au niveau des vibrisses où convergent l'ensemble des stimulateurs.

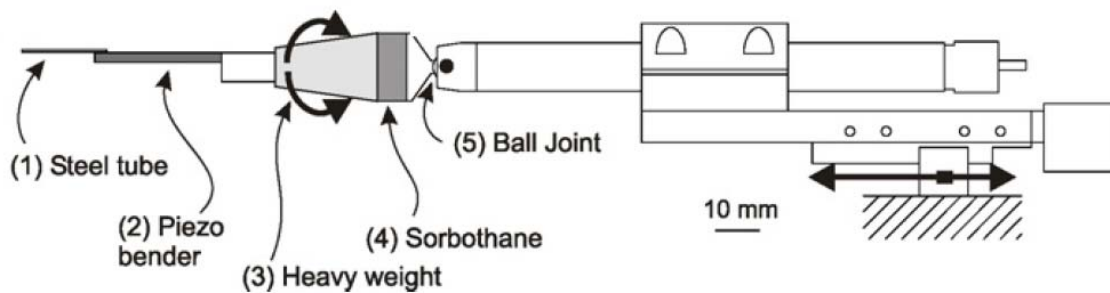


Figure III.8 : Schéma d'un stylet mécanique équipé d'un stimulateur piézoélectrique.
 (Jacob, Estebanez et al. 2010)

Le transducteur piézoélectrique (2) à l'extrémité duquel est collé le tube métallique (1) contenant la vibrisse est fixé sur une masselotte métallique (3). Cette masselotte est couplée à un élastomère (4) afin d'isoler mécaniquement le stimulateur. L'ensemble est relié au stylet par une rotule (5) permettant un mouvement angulaire 2D. Le stylet est fixé sur une platine de translation 1D qui permet d'ajuster la position du bout du stimulateur suivant son axe.

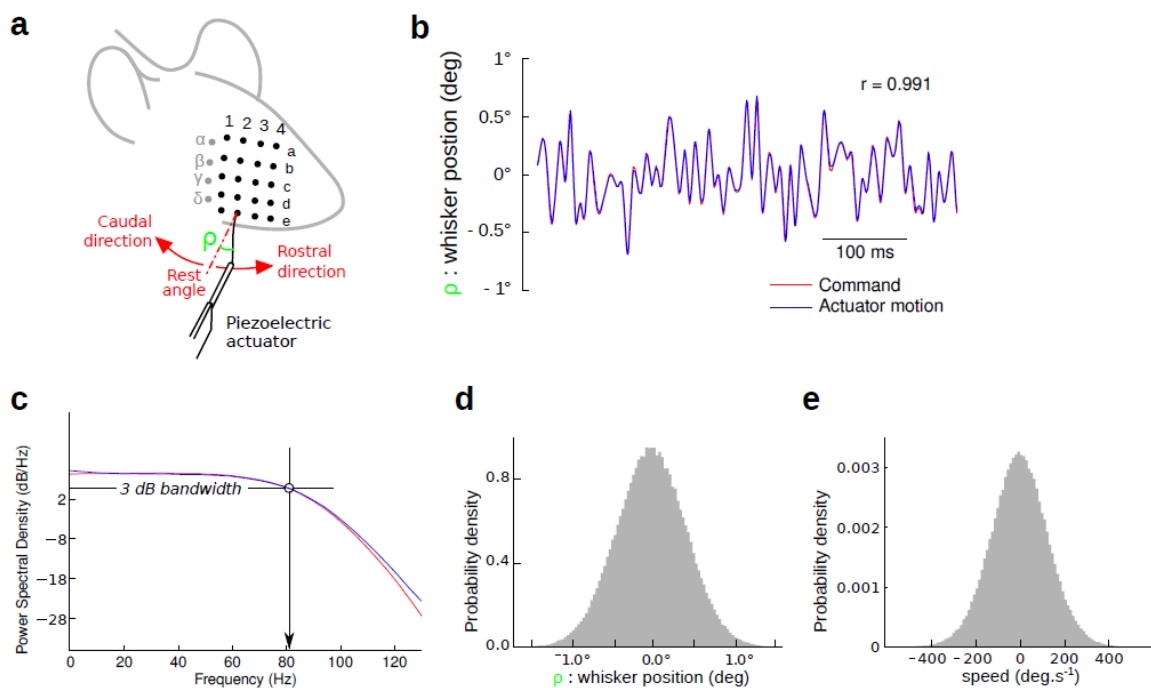


Figure III.9 : Caractérisation des stimuli appliqués (Estebanez et al., 2012)
 (a) Schéma des vibrisses stimulées. Les flèches rouges indiquent le mouvement rostro caudal et la position de repos. ρ : angle de déflexion.
 (b) Représentation temporelle de la commande (rouge) appliquée en entrée et du déplacement angulaire mesuré en sortie (bleu)
 (c) Densité de puissance spectrale pour la commande (rouge) et le déplacement angulaire en sortie (bleu). La bande passante à 3dB est de 82Hz.
 (d) Distribution des déplacements angulaires mesurés lors de l'application d'un bruit Gaussien
 (e) Distribution des vitesses angulaires mesurées lors de l'application d'un bruit Gaussien

Protocole de stimulation

Afin d'étudier la sélectivité à la phase et à la direction ainsi que la corrélation entre les deux, nous avons donc couplé une phase et une direction pour chaque stimulation de chaque vibrisse avec deux niveaux de corrélation.

Idéalement il faudrait étudier un maximum de couples phase/direction avec le plus grand nombre de stimulations possible. Cependant, il faut également tenir compte des paramètres d'intervalle temporel entre les stimuli (ISI) et de durée d'enregistrement. En effet, l'ISI joue un rôle important dans l'intégration multi vibrissale et la durée totale d'enregistrement est limitée à cause du photo-blanchiment. On a donc choisi d'appliquer sur chaque vibrisse les stimulations à des instants tirés d'une distribution Poissonnienne ayant une constante de temps de 500ms et une période réfractaire de 40ms. Les stimulations sont tirés au hasard parmi la composition de l'une des deux phases principales V1 ou V2 avec l'une des quatre directions caudo-rostrale, rostro-caudale,

dorso-ventrale ou ventro-dorsale. Par ailleurs nous avons étudié deux cas de corrélation entre les stimulations inter vibrissales, un cas parfaitement corrélé où toutes les vibrisses reçoivent le même stimulus et un cas totalement décorrélé où chaque vibrisse reçoit une stimulation indépendante (figure III.10). Le temps total du protocole de stimulation est de 60 à 80 minutes, permettant la présentation de 18 à 24 fois de chaque stimulus élémentaire (une phase appliquée dans une direction, de manière corrélée ou décorrélée pour chaque vibrisse). Cette statistique de présentation devrait être suffisante compte tenu des expériences précédentes d'Estebanez et al en électrophysiologie.

Pour obtenir une reproduction parfaite du stimulus choisi, le signal de commande est préalablement modulé par la fonction de transfert inverse des transducteurs piézoélectrique. La stimulation mécanique appliquée par le stimulateur a été vérifiée à l'aide d'un capteur optique de position à haute résolution spatio-temporelle (Micro-ε, OptoNCDT 1700). De plus, le signal de stimulation est synchronisé sur l'horloge d'acquisition du microscope.

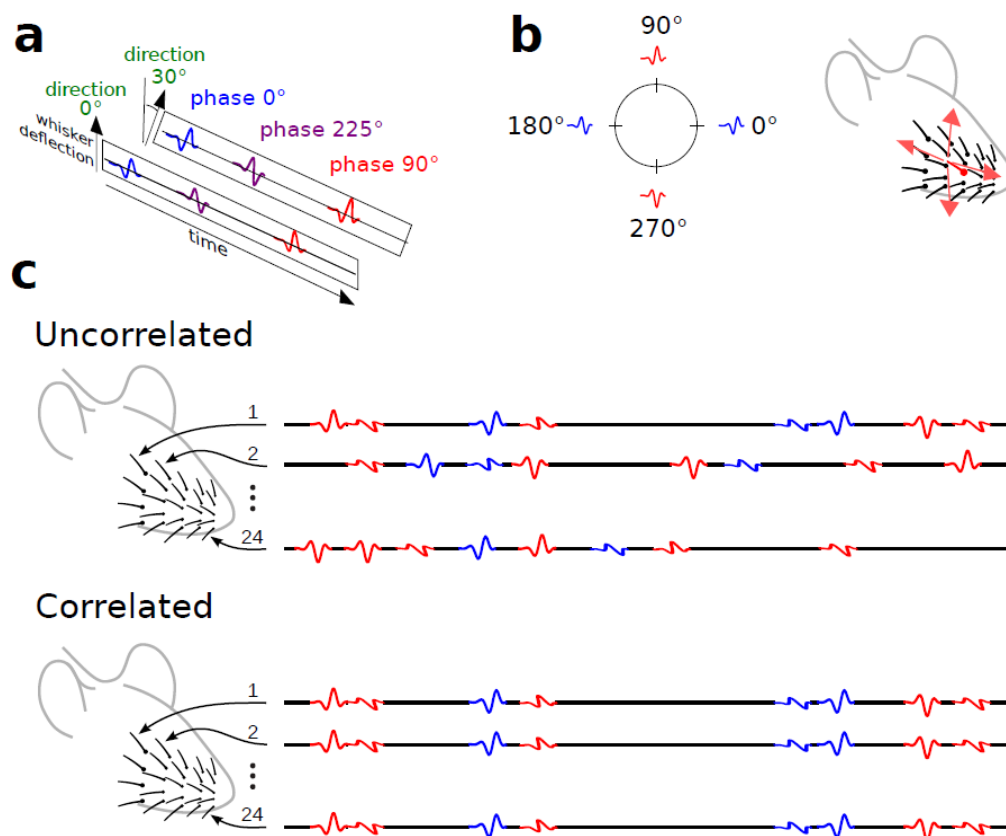


Figure III.10 : Protocoles de stimulation corrélés et décorrélés des 24 vibrisses pour étudier la sensibilité à la phase et à la direction.

(a) La direction et la phase sont deux paramètres indépendants qui peuvent être combinés.
 (b) Le protocole combine les 2 phases principales correspondant aux vecteurs $V1$, $V2$ aux 4 directions principales rostro-caudale, caudo-rostrale, dorso-ventrale et ventro-dorsale.
 (c) Les stimulations correspondant à une phase et une direction données sont jouées suivant une séquence Poissonienne sur chacune des vibrisses. Ces séquences sont soit totalement décorrélées soit complètement corrélées d'une vibrisse à l'autre suivant le protocole (« corrélé » ou « décorrélé »)

III.2.5 Histologie

Compte tenu du caractère crucial de l'information spatiale dans mon étude, les reconstructions histologiques se devaient d'être extrêmement précises.

A l'issu des enregistrements, les animaux sont tués par overdose de pentobarbital et perfusés cardiaquement par une solution saline puis une solution de para formaldéhyde. Ensuite le cortex est prélevé et aplati avant d'être tranché tangentiellement par épaisseur de 100 μ m. Les tranches sont ensuite traitées par un marquage cytochrome oxydase révélant les tonneaux corticaux de la couche IV.

Chaque tranche est imagée en lumière blanche et en lumière fluorescente à l'aide d'une loupe et la reconstruction de l'empilement des tranches est effectuée par superposition des zones marquées en Oregon Green et surtout de la vascularisation des ces zones. Ensuite, les tonneaux corticaux sont repérés sur la couche correspondante et le plan où a eu lieu l'imagerie replacé sur la tranche ad hoc (figure III.11).

Pour améliorer la précision de notre reconstruction, nous avons observé qu'il était possible de mettre en évidence directement la position de l'enregistrement dans les tranches révélées à la cytochrome oxydase. A la fin de chaque enregistrement, le champ imagé a été balayé à la pleine puissance du laser à $\lambda=850$ nm. Lors du marquage en cytochrome oxydase, la zone en question est révélée par une zone carrée blanche caractéristique (figure III.12). Cette zone blanche n'apparait jamais si l'enregistrement est effectué à 920nm. Par conséquent, en s'écartant du pic d'absorption de notre sonde fluorescente OGB-1 en direction des basses longueurs d'onde et en augmentant la puissance incidente au maximum possible, on affecte l'activité enzymatique dans les mitochondries, ce qui est révélé par notre marquage. Nous disposons donc à 30 μ m près de la position de notre champ imagé dans le plan horizontal xy au-dessus des tonneaux corticaux.

Afin de pouvoir regrouper nos données lors de certaines analyses, nous avons été amené à projeter celle-ci à l'échelle d'un tonneau normalisé voire de S1bf normalisé :

Normalisation des tonneaux : Après avoir identifier chaque neurone par rapport à son tonneau le plus proche, le barycentre de chaque tonneau est calculé puis assimilé au centre du tonneau normalisé. Ensuite, une droite est tracée entre ce centre et le neurone et l'intersection de cette droite avec la frontière du tonneau est choisie comme unité de distance ($r=0$ sur le barycentre et $r=1$ sur le contour du tonneau). La position radiale r de chaque neurone est ainsi normalisée. La position angulaire α de chaque neurone est mesurée par rapport à une référence $\alpha=0$ sur l'axe d'alignement des tonneaux d'une même rangée (figure III.18.a).

Normalisation de S1bf : Pour chaque champ S1bf obtenu en histologie, les barycentres des tonneaux sont définis comme points de repère à partir desquels le champ est projeté sur un champ S1bf de référence à l'aide d'une transformation affine (rotation, translation, homothétie) (figure III.27).

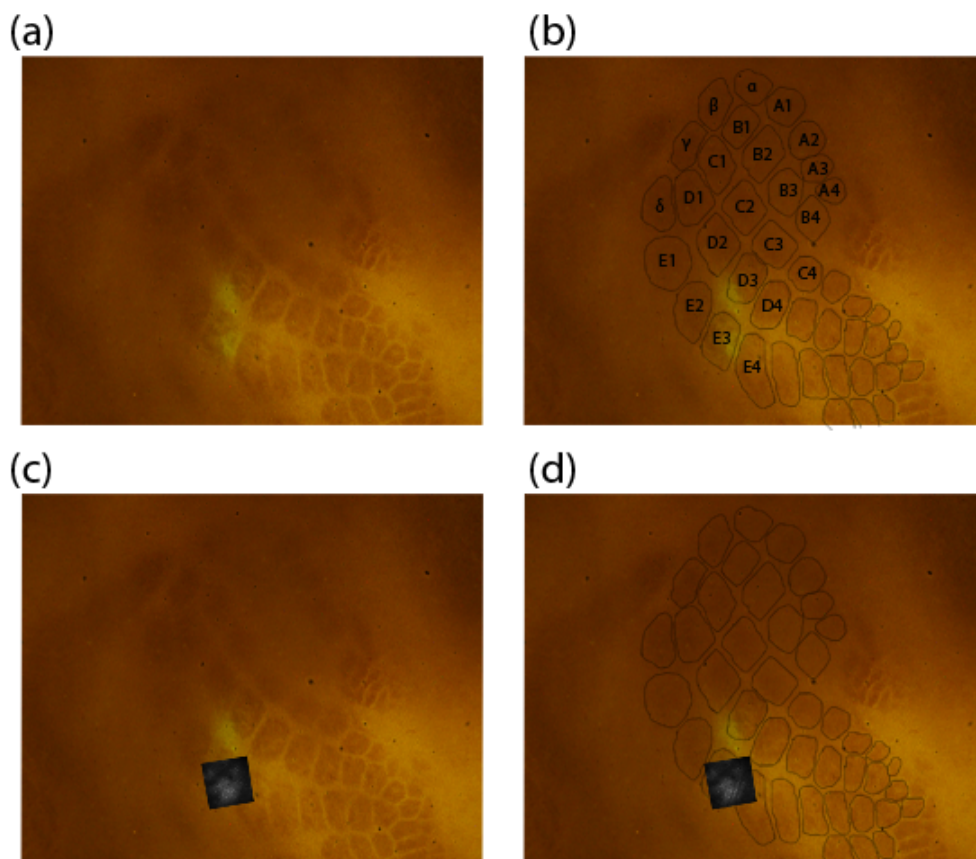


Figure III.11 : Reconstruction histologique

(a) Tranche marquée en cytochrome oxydase. On observe les tonneaux corticaux ainsi que la zone marquée en Oregon Green.

(b) Tranche (a) avec le contour des tonneaux corticaux.

(c) Tranche (a) avec le champ imagé recalé.

(d) Superposition des tranches précédentes.

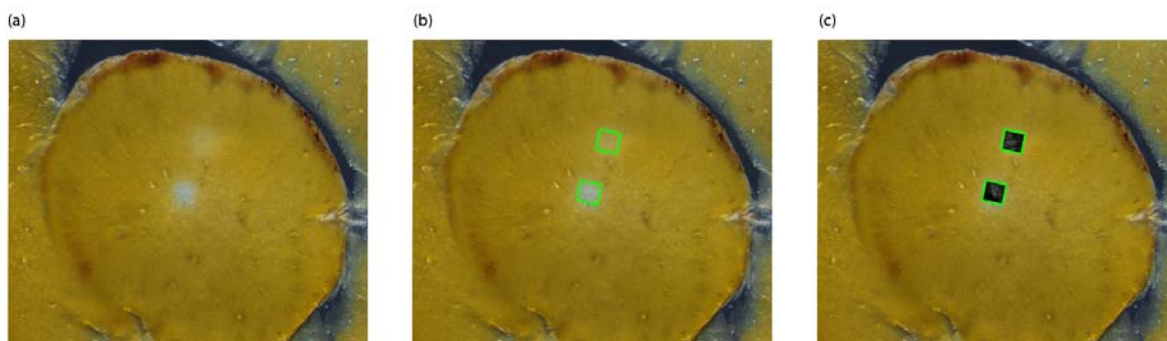


Figure III.12 : Localisation directe des lieux d'enregistrements.

(a) Tranche en couche II/III du cortex à tonneaux dont les lieux d'enregistrement ont été marqués en balayant le champ avec la totalité de la puissance laser à $\lambda=850\text{nm}$ ($P\approx 1.2W$ en sortie laser) et traitée en cytochrome oxydase.

(b) Les champs marqués optiquement en (a) sont repérés (carrés vert)

(c) Les champs enregistrés sont repositionnés dans la reconstruction histologique.

III.3. Résultats

III.3.1 Champs récepteurs

Dans un premier temps, nous avons vérifié à partir des enregistrements et des reconstructions histologiques que les champs récepteurs mesurés pour les cellules enregistrées étaient cohérents avec la position de ces cellules en couches II/III. Nous considérons qu'une vibrisse est incluse dans le champ récepteur d'une cellule dès lors que le Z score moyenné sur toutes les huit conditions obtenues pour les stimulations décorréliées impliquant la vibrisse en question (4 phases x 2 axes = 8 conditions) dépasse un seuil de 3,5 (seuil correspondant à une probabilité de $p=2,5 \cdot 10^{-4}$ d'avoir un transitoire dont l'origine est du bruit). Ainsi, le champ récepteur des cellules présentant une activité significative inclut systématiquement la vibrisse associée au tonneau de la couche IV situé immédiatement en-dessous des cellules considérées. Sur un échantillon de 338 neurones pris sur 13 enregistrements différents, 124 cellules présentaient un champ récepteur mono vibrissal (figure III.13.a et b) et 9 cellules présentaient un champ récepteur de deux vibrisses ou plus (figure III.13.c et d). Le champ récepteur mesuré n'est jamais supérieur à 3 vibrisses.

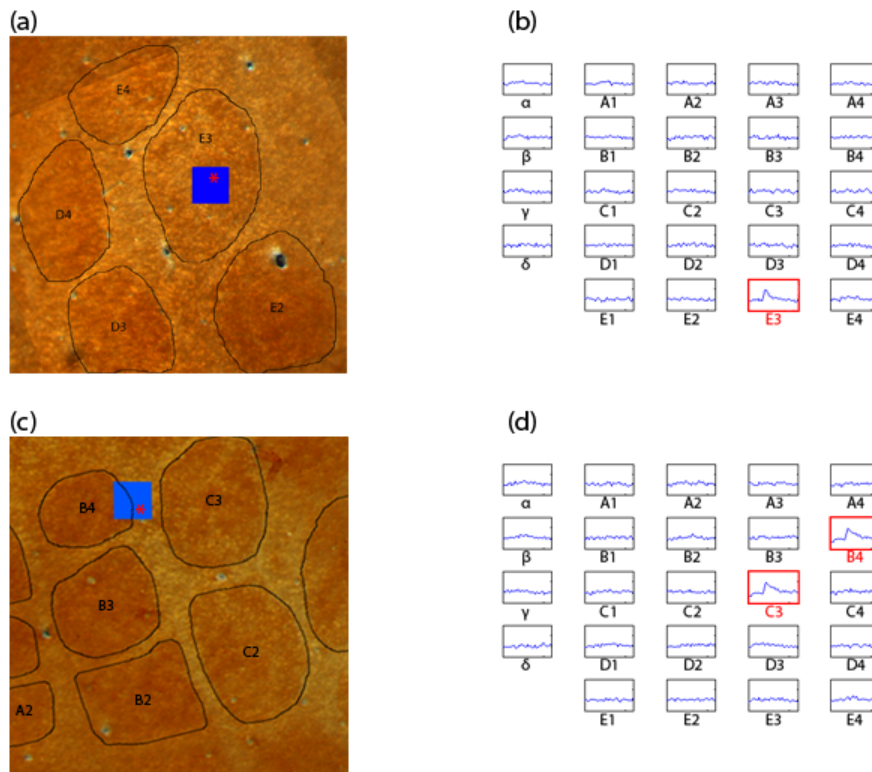


Figure III.13 : Champs récepteurs

(a) Reconstruction histologique d'un enregistrement effectué au-dessus du tonneau E3. Le champ imagé au cours de l'enregistrement est représenté par le carré bleu. L'étoile rouge représente le neurone dont le champ récepteur est présenté en (b).

(b) Champ récepteur du neurone représenté en (a) par l'étoile rouge. Chaque trace correspond à la valeur moyenne $\frac{\Delta F}{F}$ sur toutes les stimulations de la vibrisse correspondante ($N=147$ stimulations par vibrisse). La réponse pour chaque vibrisse est représentée pour une durée de 1,25s.

(c) Reconstruction histologique d'un enregistrement effectué au-dessus des tonneaux B4 et du septum entre B4 et C3. Le champ imagé au cours de l'enregistrement est représenté par le carré bleu. L'étoile rouge représente le neurone dont le champ récepteur est présenté en (d).

(d) Champ récepteur du neurone représenté en (c) par l'étoile rouge ($N=150$ stimulations par vibrisse). La réponse pour chaque vibrisse est représentée pour une durée de 1,25s.

III.3.2 Cellules globales et cellules locales

Définition des populations globales et locales

Le caractère global ou local d'une cellule est défini à partir de sa réponse à la stimulation décorrélée d'une part et à la stimulation corrélée d'autre part. En fait, la grande majorité des cellules présentant une activité pour la stimulation décorrélée répondent également pour la stimulation corrélée (figure III.14). Ainsi, les cellules prises en comptes dans l'étude sont sélectionnées à partir de la réponse à la stimulation corrélée

selon le critère : Z score maximum > 5 (le Z score maximum sur les huit types de stimulations présentés sur la vibrisse principale). Le critère de discrimination entre cellules globales et cellules locales a donc été défini à partir de la réponse à la stimulation décorrélée : les cellules présentant un Z score maximum supérieur à 3.5 (seuil correspondant à une probabilité de 1% d'avoir un transitoire dont l'origine est du bruit) pour la stimulation décorrélée sont considérées comme locales, les autres étant globales (figure III.15).

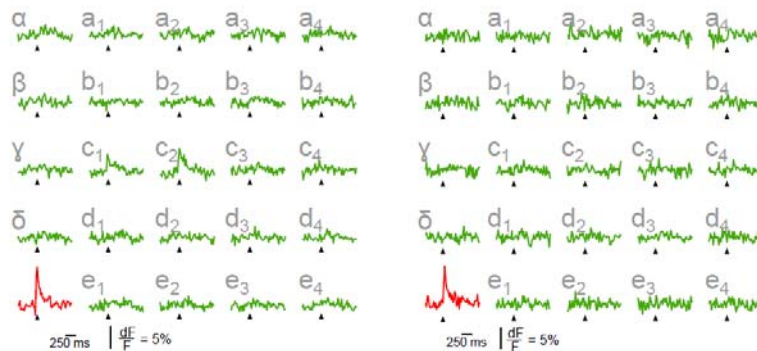


Figure III.14 : Réponses (« stimulus triggered average ») $\frac{\Delta F}{F}(t)$ des cellules globales et locales. A gauche, Réponse maximale d'un neurone local pour une stimulation décorrélée en phase et en direction des 24 vibrisses (en vert, vibrisse principale = C2) et pour une stimulation corrélée (rouge). A droite, idem pour un neurone global. Pour N=338 cellules, 40% présentent un caractère local, 16% un caractère global et 44% ne présentent pas de réponse significative.

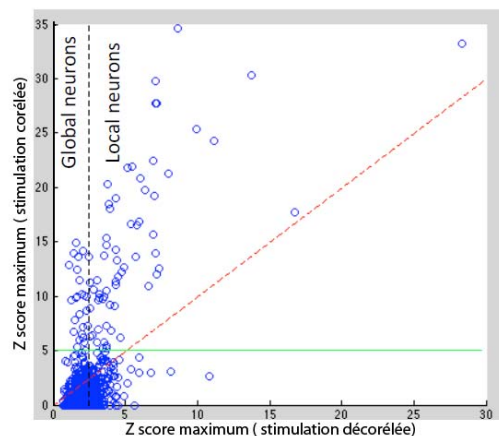


Figure III.15 : Critère de sélection des cellules pour l'étude local/global. Seules sont prises en compte les cellules présentant un Z score maximum supérieur à 5 pour la stimulation corrélée. Celles présentant un Z score maximum supérieur à 3.5 pour la stimulation décorrélée sont considérées comme locales, les autres étant globales.

Localisation des cellules globales et locales

A partir des reconstructions histologiques nous avons étudié la localisation des cellules en fonction de leur caractère global ou local. La figure III.16 présente le résultat d'une reconstruction histologique sur laquelle ont été repositionnées les cellules enregistrées au cours d'une expérience. Sur cet exemple, il apparaît une tendance assez prononcée : les neurones globaux (en vert sur la figure III.16) se retrouvent majoritairement à la verticale du septum tandis que les neurones locaux (en rouge sur la figure III.16) semblent former la catégorie dominante au dessus des tonneaux. Cet exemple suggère une répartition inhomogène des neurones locaux et globaux en couche 2/3 du cortex, avec les frontières entre septa et tonneaux comme lignes de ségrégation.

Pour confirmer cette tendance, nous avons classé systématiquement 135 neurones en deux catégories selon la structure à la verticale de laquelle ils étaient situés : un septum ou un tonneau. La figure III.17 donne la distribution des Z scores maximaux obtenus lors de stimulations décorréélées pour ces deux catégories de neurones. Parmi les cellules locales (Z scores > 3.5), la majorité se retrouve au-dessus des tonneaux (82% au-dessus des tonneaux, et 18% au dessus des septa). Et malgré la plus petite fraction de surface correspondant à des septa comparé à celle correspondant à des tonneaux, les cellules globales (Z scores < 3.5) se retrouvent légèrement plus nombreuses au-dessus des septa qu'au-dessus des tonneaux (54% au-dessus des septa et 46% au-dessus des tonneaux). Ces différences de répartition modifient la coloration « globale/locale » majoritaire se retrouvant à la verticale des différentes structures : la majorité des cellules situées au-dessus des tonneaux sont des cellules locales (locales = 82% ; globales = 18%) tandis que la majorité des cellules au-dessus des septa sont des cellules globales (globales = 63% ; locales = 37%). Enfin, on peut noter que les cellules locales situées dans la colonne d'un tonneau ont un caractère local plus prononcé que leurs homologues locales appartenant aux colonnes au-dessus des septa puisque le Z score des premières vaut en moyenne 5.25 et celui des secondes vaut en moyenne 4.25. En parallèle, les cellules globales des colonnes septales ont aussi un caractère global plus prononcé (Z score moyen = 1.83) que les cellules globales situées au-dessus des tonneaux (Z score moyen = 2.26).

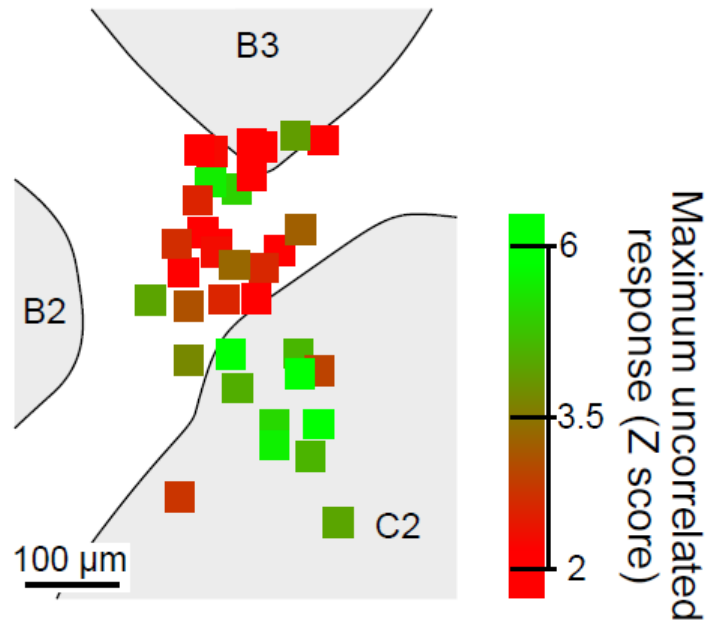


Figure III.16 : Exemple de superposition entre la couche IV (tonneaux en gris et septa en blanc) et les neurones enregistrés en couche II/III pour des stimulations décorréelées. Chaque carré correspond à un neurone dont le caractère local ou global est défini par son Z score maximum à la stimulation décorréelée (global en rouge et local en vert).

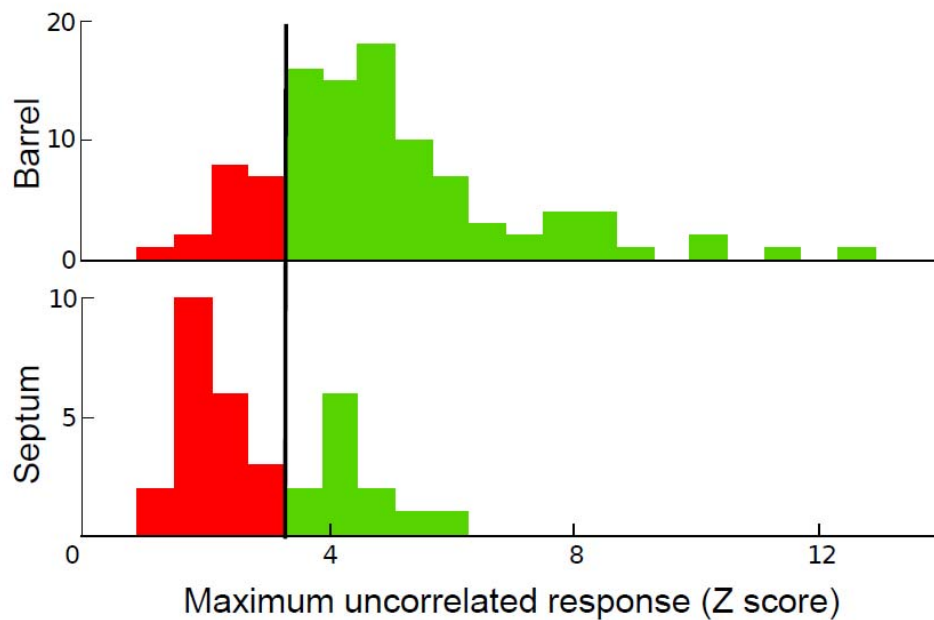


Figure III.17 : Analyse de population des Z score pour les neurones situés respectivement au-dessus d'un tonneau (en haut) ou au-dessus d'un septum (en bas). Le seuil $Z=3.5$ sépare les deux populations locales et globales.

La ségrégation globale/locale précédente repose sur un critère binaire d'appartenance au septum ou au tonneau. Compte tenu de l'imprécision sur la définition de la frontière tonneau/septum d'environ $30\mu\text{m}$ lors de la reconstruction histologique et du fait que certains septa ne mesurent pas plus d'une cinquantaine de μm (entre tonneaux d'une même ligne), nous avons voulu évaluer la valeur de la ségrégation décrite ci-dessus en nous affranchissant du risque qui consistait à attribuer une cellule à un tonneau ou à un septum par erreur. Pour rendre le passage de la frontière tonneau/septum plus continue, nous avons introduit une coordonnée radiale normalisée pour chaque cellule par rapport au centre du tonneau le plus proche. Ainsi, en normalisant le rayon R donnant la position de chaque cellule ($R=0$ au centre du tonneau, $R=1$ à la frontière tonneau/septum) nous obtenons une nouvelle représentation de la ségrégation des cellules locales et globales moins sensibles aux erreurs de reconstruction (figure III.18). Sur cette représentation, il apparaît clairement que la position la plus probable des cellules globales se situe à l'extérieur des tonneaux avec un pic important juste derrière cette frontière, tandis que la position la plus probable des cellules locales se situe à l'intérieur des tonneaux. Lorsqu'on prend en compte le fait que la surface correspondant à un rayon R varie en R^2 , on s'aperçoit même que la densité de cellules locales culmine pour un rayon de 0.5, c'est à dire très nettement à l'intérieur de la colonne d'un tonneau.

Toutes ces analyses confirment bien que les cellules globales et locales ne se répartissent pas uniformément en couche 2/3 du cortex et qu'elles suivent une carte associée aux tonneaux et aux septa.

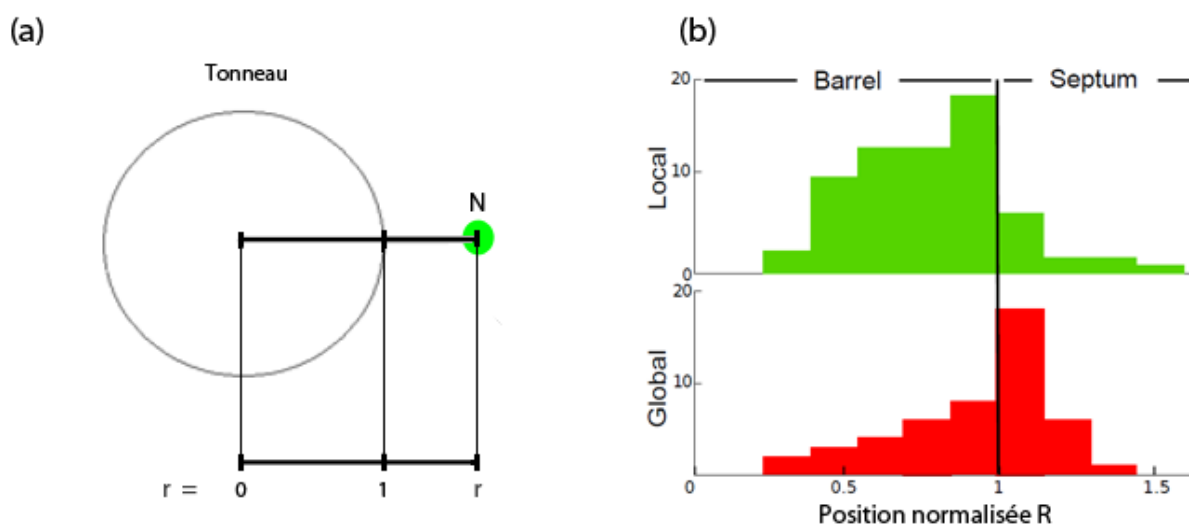


Figure III.18 : Distribution des neurones locaux et globaux en fonction de leur position radiale normalisée au sein du tonneau.

(a) Définition de la position radiale normalisée, le rayon normalisé r du neurone N (en vert) vaut 0 au centre du tonneau et 1 à la frontière entre tonneau et septum.

(b) Distribution des neurones locaux (en haut) et globaux (en bas) en fonction de leur position radiale normalisée r au sein du tonneau. Les histogrammes donnant le nombre de cellules en fonction de r représentent les données obtenues sur 10 enregistrements ($N=3$ rats).

III.3.3 Sélectivités à la phase et à la direction

Interdépendance des paramètres de stimulation

Nous avons appliqué des stimulations composées de composantes des vecteurs V_1 (vitesse) et V_2 (position) suivant les deux directions rostro-caudale et dorso-ventrale afin d'étudier l'éventuelle corrélation entre ces deux sélectivités (phase et direction) pour les neurones des couches II/III.

i. Influence de la phase sur la sélectivité à la direction

Nous nous sommes demandés si la sélectivité à la direction précédemment étudiée par Kremer et al. était dépendante de la phase. Nous avons donc analysé les réponses des neurones aux stimulations décorréliées et nous nous sommes concentrés sur les réponses à leur vibrisse principale. Sur un échantillon de 99 neurones présentant des réponses significatives aux stimulations en phase et en direction, nous avons projeté sur l'espace des directions la réponse de chaque neurone au vecteur V_1 ($\langle \frac{\Delta F}{F}(t) \rangle$ pour chaque direction). A partir de ces réponses dans chaque directions nous obtenons ainsi l'angle θ_1 définissant la direction préférentielle des réponses au vecteur V_1 (voir méthodes). De même nous avons défini θ_2 la direction préférentielle des réponses au vecteur V_2 . La plupart des cellules ne présentent pas de corrélation entre θ_1 et θ_2 (figure III.19). Pour l'ensemble des neurones étudiés, θ_1 et θ_2 présentent un coefficient d'association linéaire (Fisher 1993) $\rho_1=0.0017$ ($p=0.48$), donc ces deux angles sont clairement non corrélés.

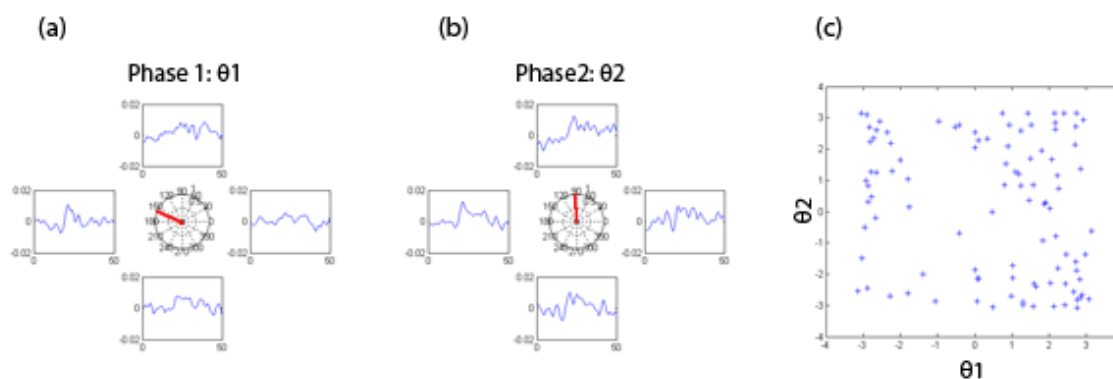


Figure III.19 : Directions préférentielles pour les vecteurs « vitesse » V_1 et « position » V_2 .

(a) Exemple d'angle θ_1 (au milieu en rouge) résultant de la projection des réponses au vecteur « vitesse » (V_1) suivant les quatre directions (C-R à droite, R-C à gauche, V-D en haut et D-V en bas) pour une cellule. Les réponses sont en % et représentées sur 50 images soit 1.25s. Les stimulations sont moyennées sur un nombre de 18 réalisations de chaque condition.

(b) Exemple d'angle θ_2 résultant de la projection des réponses au vecteur « position » (V_2) suivant les quatre directions pour la même cellule que celle présentée en (a) (conditions identiques).

(c) « raster plot » : θ_2 en fonction de θ_1 pour 99 neurones ($N=3$ rats)

ii. *Influence de la direction sur la sélectivité à la phase*

Nous nous sommes demandé si la sélectivité à la phase évoquée précédemment était dépendante de la direction. Sur le même échantillon de 99 neurones présentant des réponses significatives aux stimulations en phase et en direction, nous avons projeté sur l'espace des phases la réponse de chaque neurone à la direction rostro-caudale. Nous obtenons ainsi la phase φ_H définissant la phase préférentielle des réponses à la direction « Horizontale » (i.e. rostro-caudale). De même nous avons défini φ_V la phase préférentielle des réponses à la direction « Verticale » (i.e. dorso-ventrale). Sur l'ensemble des cellules testées, φ_H et φ_V ne présentent pas de corrélation particulière (figure III.20). φ_H et φ_V présentant un coefficient d'association linéaire $\rho_T = -0.0005$ ($p=0.5$), ces deux angles sont donc clairement non corrélés.

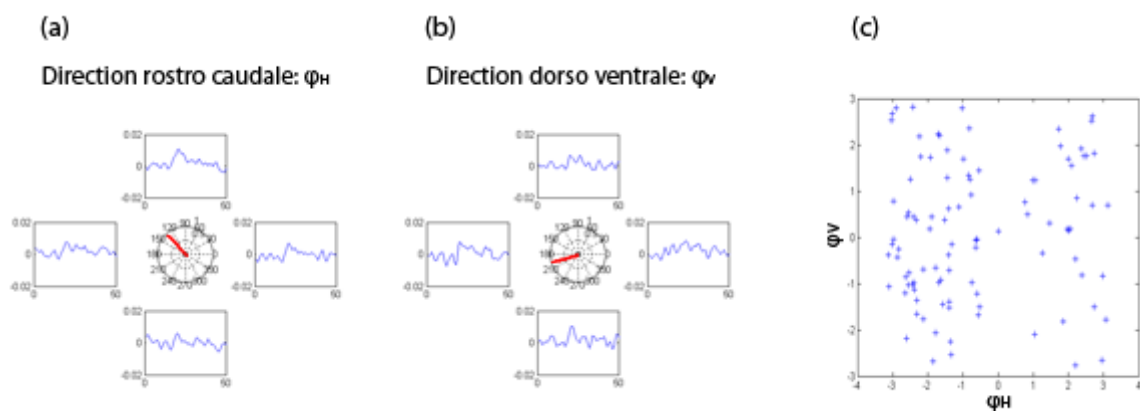


Figure III.20 : Phases préférentielles pour les directions rostro-caudale (H) et dorso-ventrale (V).

(a) Exemple de phase préférentielle φ_H (au milieu en rouge) résultant de la projection sur la direction rostro-caudale des réponses aux quatre phases testées (φ_1 à droite, $-\varphi_1$ à gauche, φ_2 en haut et $-\varphi_2$ en bas) pour une cellule. Les réponses sont en % et représentées sur 50 images soit 1.25s. Les stimulations sont moyennées sur un nombre de 18 réalisations de chaque condition.

(b) Phase préférentielle φ_V pour la même cellule qu'en (a), φ_V est différente de φ_H obtenue de la même manière pour la direction rostro caudale.

(c) « Raster plot » : φ_V en fonction de φ_H pour 99 neurones (N=3 rats)

iii. *Corrélations croisées entre sélectivité à la phase et la sélectivité à la direction*

Ces différentes sélectivités en phase et en direction sont nouvelles et leur interdépendance est encore mal comprise. Pour cette raison nous avons étudié les liens éventuels qui relient ces différentes sélectivités. Nous avons calculé les corrélations croisées entre les phases φ_i et les angles θ_j . Celles-ci ne montrent pas non plus de corrélations importantes (figure III.21) :

- $\rho_T(\theta_1/\varphi_H) = -0.1282$ ($P=0.005$) *
- $\rho_T(\theta_1/\varphi_V) = -0.0267$ ($P=0.24$)
- $\rho_T(\theta_2/\varphi_H) = 0.0031$ ($P=0.47$)
- $\rho_T(\theta_2/\varphi_V) = -0.2125$ ($P<0.00005$) *

En fait, certains de ces angles sont corrélés (*) mais la corrélation est faible et explique une fraction très minoritaire de la variance ($\rho_T \ll 1$).

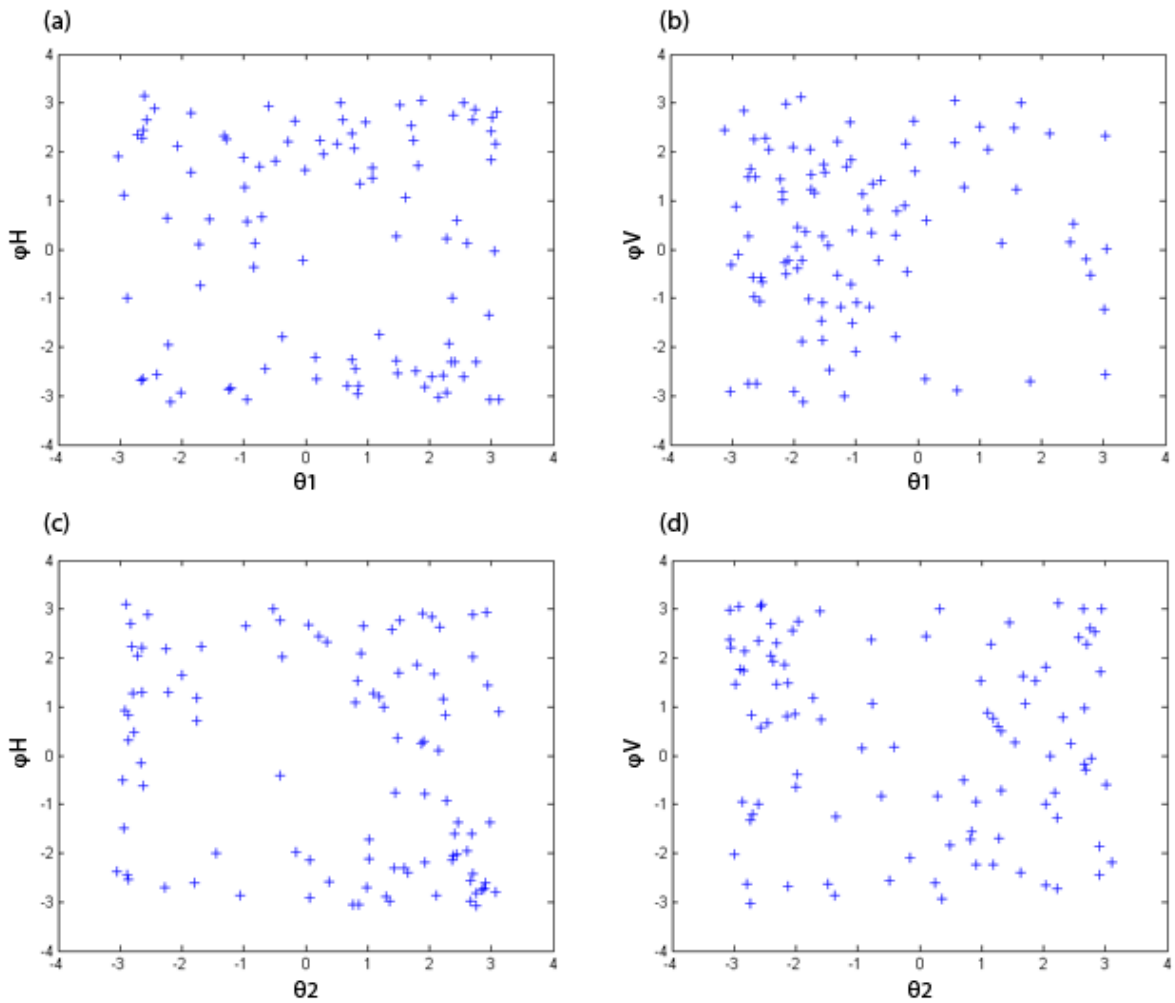


Figure III.21 : Corrélations croisées entre θ_1 , θ_2 , φ_H et φ_V . (99 neurones, $N=3$ rats)
 (a) « raster plot » : φ_H en fonction de θ_1 .
 (b) « raster plot » : φ_V en fonction de θ_1 .
 (c) « raster plot » : φ_H en fonction de θ_2 .
 (d) « raster plot » : φ_V en fonction de θ_2 .

Cartographie des préférences directionnelles

i. Préférence directionnelle à l'échelle d'un champ de neurones

Comme dans la section précédente II.3.1, les résultats présentés ici sont tous obtenus dans le cadre d'une stimulation décorrélée. Il s'agit donc de sélectivité directionnelle des phases d'un point de vue monovibrissal. Il faut noter cependant que les résultats présentés dans ce qui suit sont encore préliminaires.

Un intérêt majeur des enregistrements optiques de l'activité neuronale réside dans leur capacité à fournir une information spatiale sur les positions relatives des cellules mesurées. Notre étude nous permet donc de quantifier les distributions spatiales des sélectivités. En regardant plus particulièrement la préférence directionnelle des vecteurs V_1 (phase φ_1) et V_2 (phase φ_2) en stimulations décorrélées, nous remarquons que sur certains champs l'ensemble des cellules présentent des préférences directionnelles similaires pour φ_1 d'une part et φ_2 d'autre part : la direction préférentielle pour φ_1 est différente de celle pour φ_2 mais chacune est commune à l'ensemble des neurones (figure III.22.a). Cependant sur d'autres champs, cette corrélation locale est moins évidente (figure III.22.b, panel de gauche)

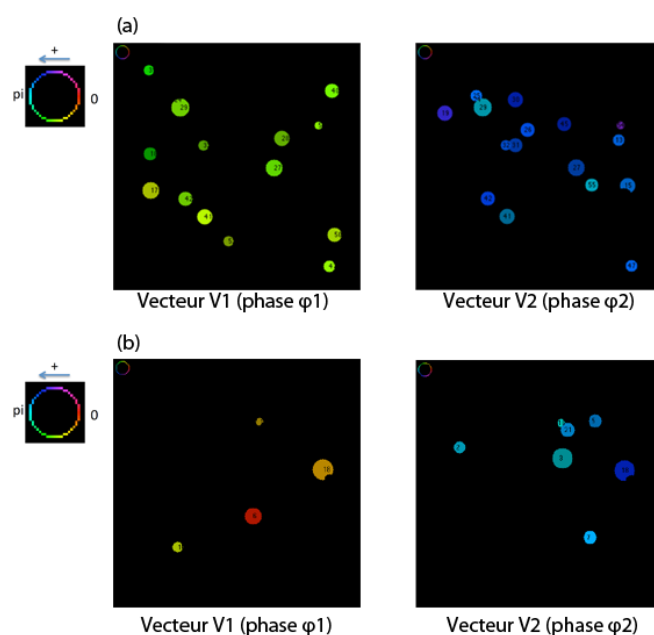


Figure III.22 : Corrélations spatiales de sélectivité à la direction pour les vecteurs V_1 (phase φ_1) et les vecteurs V_2 (phase φ_2) en réponse aux stimulations décorrélées
(a) Sélectivité à la direction (couleur) pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) sur un champ de $150\mu\text{m}$ de côté. $\theta=0$ correspond à la direction caudo-rostral, $\theta=\pi/2$ correspond à la direction ventro-dorsale. θ_1 et θ_2 sont chacun assez uniformes pour l'ensemble des cellules du champ.
(b) Sélectivité à la direction (couleur) pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) sur un autre champ de $150\mu\text{m}$ de côté. θ_1 n'est pas vraiment uniforme pour l'ensemble des cellules du champ (θ_2 est lui plus uniforme).

ii. *Préférence directionnelle à l'échelle du tonneau*

Les résultats du paragraphe précédent suggèrent l'existence d'une organisation spatiale à une échelle plus grande que la taille des champs que notre technique d'enregistrement nous permet d'acquérir simultanément. Pour tenter d'observer les couches 2/3 du cortex somato-sensoriel à une échelle plus large tout en conservant la résolution nécessaire à l'étude des propriétés de chaque cellule individuelle, nous avons adopté deux stratégies. La première consiste à essayer d'accumuler pour un même animal le maximum de champs d'enregistrement positionnés de la façon la plus contiguë possible et étudiés les uns après les autres. Cette approche possède l'avantage de cartographier l'organisation spatiale d'un seul animal, ce qui la rend insensible aux éventuelles variations inter-animales. Mais son champ d'action est limitée par la durée maximale pendant laquelle un animal peut tolérer l'anesthésie, voire la durée maximale pendant laquelle le marquage OGB1 reste de bonne qualité (contrainte en général plus restrictive). La deuxième stratégie consiste à regrouper les enregistrements obtenus sur plusieurs animaux, ce qui permet potentiellement d'observer des zones plus larges en renouvelant suffisamment l'expérience, mais qui nous expose aussi davantage aux éventuelles différences de cartographie qui pourrait exister entre individus. Aucune de ces deux stratégies n'est parfaite, et dans tous les cas elles demandent toutes un très lourd investissement en temps d'expérience. Nous présentons ici les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec ces deux stratégies.

En rassemblant les données de plusieurs enregistrements obtenus sur un même animal au-dessus d'un même tonneau (figure III.23), nous pouvons observer l'organisation de la sélectivité directionnelle pour les vecteurs V_1 et V_2 à l'échelle du tonneau. Ces données qui regroupent pourtant les données de 8 champs de $150 \times 150 \mu\text{m}$ ne permettent pas de couvrir la totalité d'un seul tonneau. Une analyse qualitative de ces données nous montre d'abord l'existence de similarités importantes entre les préférences directionnelles des cellules sur des distances de $100 \mu\text{m}$ à quelques centaines de μm sur une grande partie des champs observés. Certains champs cependant présentent des fluctuations spatiales plus rapides. Ce comportement pourrait ressembler à celui attendu pour une organisation spatiale agencée en « camembert » inscrit dans le tonneau. Et en effet, bien que partielles, nos données pourraient laisser entrevoir l'existence d'une organisation en « pinwheel » pour la sélectivité à la direction du vecteur vitesse (V_1), quoiqu'il s'agisse d'un pinwheel imparfait et bruité. Pour le vecteur position (V_2), l'organisation semble moins claire.

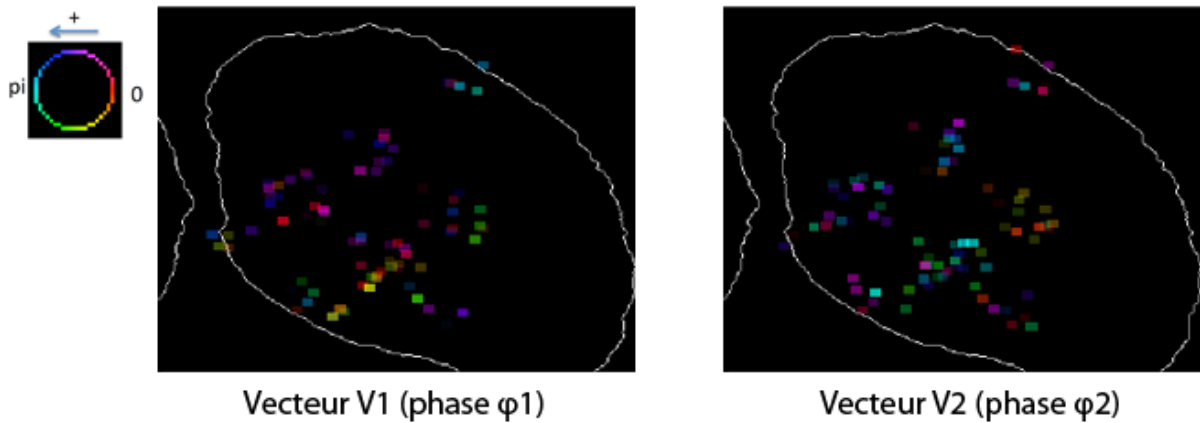


Figure III.23 : Préférences directionnelles pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) pour plusieurs enregistrements en stimulations décorréliées sur un même tonneau E3 ($N=8$ enregistrements). Pour le vecteur V_1 des corrélations locales semblent se dessiner ce qui est moins apparent pour V_2 .

Notre seconde stratégie consiste à rassembler l'ensemble des données pour tous les animaux en les projetant sur un tonneau normalisé (figure III.24). Dans ce cas, aucune organisation spatiale à l'échelle du tonneau pour la sélectivité directionnelle n'apparaît nettement que ce soit pour le vecteur vitesse ou pour le vecteur position.

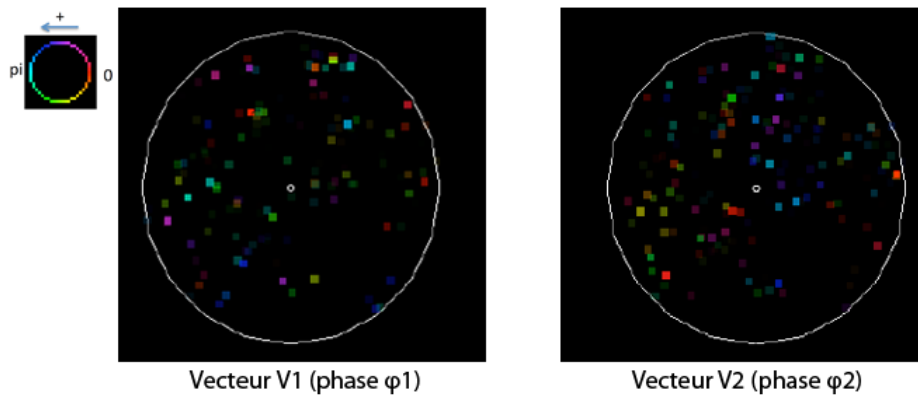


Figure III.24 : Préférences directionnelles pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) pour l'ensemble des enregistrements en stimulations décorréliées projetés sur un tonneau normalisé ($N=11$ rats). Aucune corrélation locale ne ressort nettement pour les vecteurs V_1 et V_2 .

iii. Stimulations corrélées

La même étude a été menée en s'intéressant cette fois-ci uniquement aux réponses aux stimulations corrélées. En rassemblant les données de plusieurs enregistrements au-dessus d'un même tonneau (figure III.25), nous pouvons observer l'organisation de la sélectivité directionnelle multi vibrissale pour les vecteurs V_1 et V_2 à l'échelle du tonneau. Ces données ne laissent pas présager l'existence d'une organisation particulière pour la sélectivité à la direction tant pour le vecteur vitesse (V_1) que pour le vecteur position (V_2).

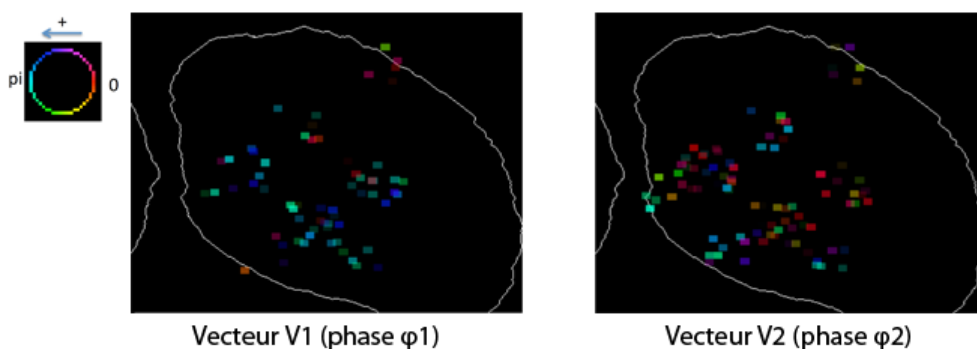


Figure III.25 : Préférences directionnelles pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) pour plusieurs enregistrements en stimulations corrélées sur un même tonneau. Pour le vecteur V_1 des corrélations locales semblent se dessiner ce qui est moins apparent pour V_2 . Aucune organisation à plus grande échelle ne ressort nettement pour les phases φ_1 et φ_2 .

Si l'on rassemble l'ensemble des données pour tous les animaux en les projetant sur un tonneau normalisé (voir méthodes) aucune corrélation locale pour la sélectivité directionnelle n'apparaît nettement que ce soit pour le vecteur vitesse ou pour le vecteur position (figure III.26).

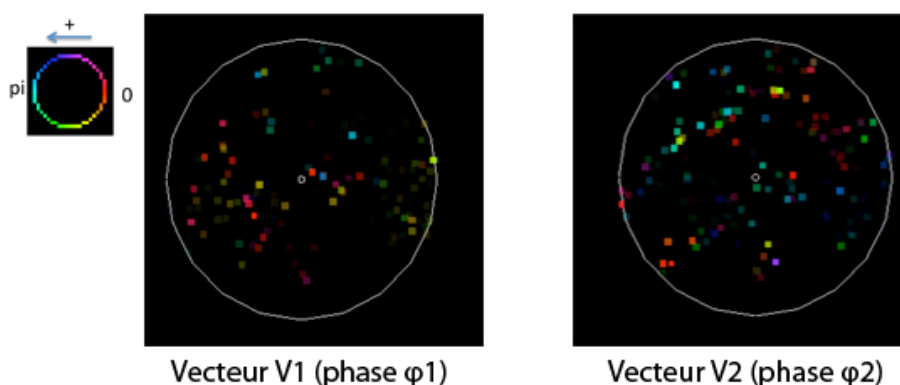
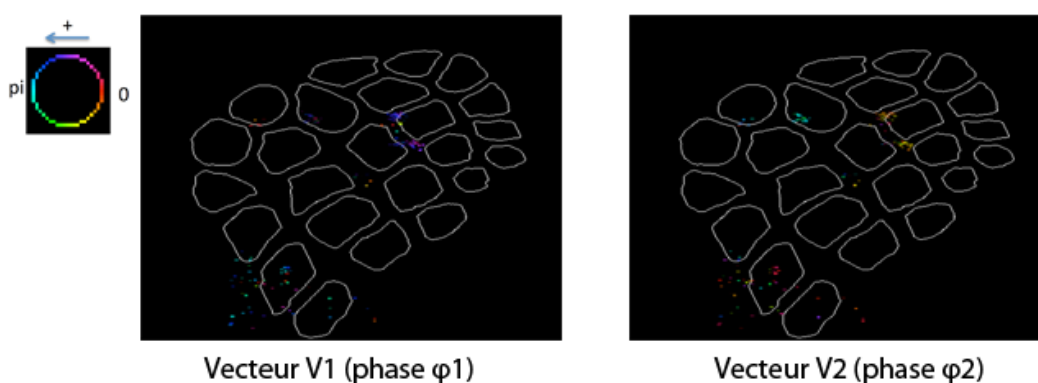


Figure III.26 : Préférences directionnelles pour les vecteurs V_1 (à gauche) et V_2 (à droite) pour l'ensemble des enregistrements en stimulations corrélées projetés sur un tonneau normalisé. Aucune organisation spatiale ne ressort nettement pour les phases φ_1 et φ_2 .

Le regroupement des données obtenues sur plusieurs animaux peut aussi s'opérer sans projeter chaque résultat sur un tonneau 'typique' normalisé si l'on soupçonne que l'échelle pertinente pour la cartographie recherchée dépasse la taille d'un tonneau. Dans ce cas, on peut par exemple regrouper les résultats de tous les animaux sur un « cortex à tonneaux normalisé ». La figure III.27 illustre ce type de représentation pour les préférences directionnelles mesurées avec des stimulations corrélées utilisant soit la phase « vitesse » soit la phase « position ». Quoiqu'encore parcellaires, nos données semblent suggérer qu'il pourrait exister une organisation à grande échelle, que nous nommons un « supra pinwheel » (figure III.27). Ceci expliquerait une sur-représentativité de certaines directions dans certains tonneaux tout comme l'absence de ces mêmes directions dans d'autres tonneaux. Ce « supra pinwheel » semblerait d'ailleurs plus marquée pour le vecteur position (V_2).



III.4. Discussion

III.4.1 Correspondance entre champs récepteurs et reconstruction histologique.

Notre étude des réponses fonctionnelles des neurones de la couche II/III du cortex somato-sensoriel du rat a fait ressortir que seule une fraction des cellules de cette zone répondait aux stimulations décorréliées que nous appliquions : parmi toutes les cellules imagées, seulement 39% présentaient une réponse détectable. Cette valeur est cohérente avec celle obtenue précédemment par Sato et al. (Sato, Gray et al. 2007) sur une étude analogue à la notre concernant la correspondance entre les champs récepteurs des neurones de la couche II/III de Sibf et la position histologique par rapport aux tonneaux chez la souris. Dans cette étude effectuée aussi en imagerie calcique, ces auteurs avaient trouvé que seulement 43,7% des cellules répondaient aux stimulations des vibrisses. Une autre étude très récente en imagerie calcique (Margolis, Lutcke et al. 2012) sur la même

région chez la souris conclut également à un pourcentage important de cellules « silencieuses » : 63% dans cette étude. Une étude récente en « whole-cell patch » sur des souris éveillées démontre elle aussi que si toutes les cellules de la couche II/III de SIbf se dépolarisent en réponse à la stimulation d'une vibrisse (contact avec un objet), seules 10% d'entre elles vont produire un potentiel d'action en réponse à un contact actif (Crochet, Poulet et al. 2011). Enfin l'étude de Le Cam et al. (Le Cam, Estebanez et al. 2011) observe avec des enregistrements extracellulaires que chez le rat en couche II/III, 32% des cellules ne répondent pas à des stimulations multivibrissales non corrélées et éparées. Le taux de cellules présentant une activité sous forme de potentiels d'action en réponse à ce type de stimulations dans notre étude est donc en accord avec les données d'études en imagerie calcique et sensiblement inférieur aux données recueillies avec des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires. Cet écart pourrait éventuellement provenir des différences de sensibilité entre ces approches expérimentales.

Cette relativement faible fraction n'en reste pas moins surprenante et il serait fondé de s'interroger sur la raison d'une participation si éparse des cellules à la représentation des stimuli tactiles dans SIbf. Notre étude sur les cellules globales et les cellules locales nous montre qu'une partie de ces cellules inactives lors de stimulations décorrélées se 'réveillent' lorsqu'on leur applique des stimulations corrélées. Dans notre cas, cela rend compte du comportement de 16% de cellules mesurées. L'étude de Margolis et al. apporte un deuxième éclairage intéressant. Elle démontre que lors d'une réorganisation fonctionnelle (suivant par exemple la coupe d'une vibrisse), ce sont principalement les cellules « silencieuses » qui modifient leur comportement, en devenant sensibles (et actives) à la stimulation des vibrisses laissées en place. Ainsi l'existence de cellules silencieuses ne serait pas un artefact expérimental de notre étude lié au type d'anesthésie ou aux formes de stimulations que nous appliquons, mais pourrait jouer un rôle fonctionnel important dans la réorganisation plastique du réseau de neurones sensoriels de SIbf lors de nouveaux apprentissages.

Nos résultats montrent qu'en couche II/III, les cellules actives ont une vibrisse principale correspondant à l'identité du tonneau au-dessus duquel elles sont placées, puis que leur champ récepteur s'élargit lorsqu'elles se retrouvent à la verticale des septa. Nos données confirment les résultats obtenus par une autre étude effectuée en microscopie à deux photons dans la même couche de SIbf chez le rat par Kerr et al. (Kerr, de Kock et al. 2007). Ces auteurs avaient montré cette correspondance entre les réponses des cellules aux stimulations de vibrisses et leur localisation en couche II/III relativement aux structures en tonneaux de la couche IV. Des études en électrophysiologie avaient elles aussi démontré ce lien chez le rat (Andermann et Moore, 2006, Le Cam et al. 2011).

L'un des apports supplémentaires de notre travail consiste à avoir mesuré le champ récepteur des cellules des couches II/III sur l'ensemble des 24 macro-vibrisses et pour toutes les directions de déflexion envisageables. Les expériences de Le Cam et al. avaient montré que le périmètre du champ récepteur des cellules pouvait varier selon le

type de stimulation qui était appliqué (cette étude avait en particulier exploré deux directions de stimulation le long de l'axe rostro-caudal). Notre mesure extensive des réponses à un nombre encore plus important de stimulations différentes nous permet d'affirmer que même dans ce cas, les champs récepteurs supra-laminaires de ces cellules restent confinés à un nombre restreint de vibrisses (<3). La très grande majorité des cellules possède une réponse mono-vibrisse (93%), et seule une petite minorité montre une réponse multi-vibrisse (bi-vibrisse : 6% ; tri-vibrisse : 1%). Nos données sont en assez bon accord avec les résultats d'Estebanez et al. (Estebanez, Boustani et al. 2012) effectués en enregistrements extracellulaires avec une matrice de stimulation de 24 vibrisses confinée à l'axe rostro-caudal (mono-vibrisse : 83% ; bi-vibrisse: 13% ; tri-vibrisse : 4%) et étendent ces résultats à des stimulations explorant les deux axes rostro-caudal et dorso-ventral.

III.4.2 Cellules globales et locales

Nos enregistrements en microscopie à deux photons de l'activité neuronale en couche II/III ont mis en évidence l'existence de deux sous populations de neurones : des cellules locales qui répondent de façon significative à la stimulation d'une vibrisse, dite principale, et les cellules globales qui répondent uniquement à une stimulation corrélée de l'ensemble des vibrisses. En se reportant à l'étude d'Estebanez et al., il est également intéressant de noter que, bien qu'en utilisant la même définition pour le caractère global ou local des cellules, les propriétés des cellules locales en couche II/III diffèrent de leurs propriétés en couche IV. En effet, une stimulation corrélée des vibrisses n'y diminue pas l'activité des cellules locales, alors que dans les couches granulaires et sous granulaires leur réponse est d'autant plus faible que la corrélation des stimulations est grande.

L'étude de l'organisation spatiale des cellules globales et locales en couche II/III révèle que les zones situées au-dessus des septa de la couche IV sont composées majoritairement de cellules globales tandis que les cellules locales se retrouvent plutôt au-dessus des tonneaux de la couche IV. Par conséquent, la répartition des cellules globales et locales s'inverse entre la couche II/III et la couche IV, où Estebanez et al. ont montré que les septa comptent une majorité de cellules locales ($\approx 90\%$) alors que les tonneaux présentent environ 65% de cellules globales (Estebanez et al., 2012).

A partir de ces observations, on peut se demander comment se construisent les propriétés des cellules locales et globales en couche II/III. Une première possibilité est que ces propriétés soient héritées des structures en amont de la couche II/III du cortex, en particulier le thalamus et la couche IV du cortex. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il existe dans ces 2 structures des cellules ayant des propriétés multivibrissales complexes (cellules globales et locales en couche IV du cortex (Estebanez et al, 2012), cellules sensibles aux mouvements globaux dans le thalamus par exemple (Ego-Stengel et al., 2012). Une seconde possibilité est que les sélectivités globales et locales se construisent au moins en partie dans la couche II/III. Deux observations soutiennent cette possibilité. La première est liée à l'anatomie : l'intégration multivibrissale en couche

II/III est rendue possible grâce d'une part à la divergence des connexions provenant des tonneaux de la couche IV (les neurones d'un tonneau se projettent en couche II/III non seulement sur les neurones situés au dessus de ce tonneau mais aussi sur les neurones situés au-dessus des tonneaux voisins) et par l'existence d'une connectivité intra-corticale horizontale à relativement longue distance en couche II/III. La seconde observation, est qu'il se produit une inversion spectaculaire de la localisation relative aux tonneaux et septa des populations locales et globales entre la couche IV à la couche II/III. Ceci est une indication très forte du fait que les sélectivités locales et globales ne sont vraisemblablement pas seulement héritées de la couche IV du cortex, mais résulteraient de l'intégration en couche II/III des informations multi vibrissales.

Il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires qui permettraient de vérifier ces hypothèses. Il serait peut-être possible de mesurer l'activité de cellules globales dans un tonneau et le septum adjacent, avant et après inactivation chimique locale des tonneaux adjacents. Nous pourrions également faire varier le nombre de vibrisses stimulées lors des stimulations corrélées (2, 4, 9 et 24 par exemple) afin de déterminer plus précisément l'apport multi-vibrissal à la construction des champs récepteurs globaux. Il serait peut-être alors possible de corréler pour chaque neurone enregistré en couche II/III, les vibrisses impliquées dans la sélectivité globale avec l'étendue du champ récepteur.

Par ailleurs, d'un point de vue méthodologique, l'étude de cette ségrégation global/local en couche II/III a été possible du fait de la très grande précision de la reconstruction histologique, celle-ci étant particulièrement facilitée par la possibilité de « marquer » optiquement la zone d'enregistrement. Nos résultats montrent que l'utilisation d'une longueur d'onde de 850nm induit l'apparition d'une zone blanchie au lieu de l'excitation lors de la reconstruction histologique après marquage en cytochrome oxydase. Cette observation disparaît avec l'utilisation d'une longueur d'onde de 920nm.

III.4.3 Sélectivités à la phase et à la direction

Le résultat le plus solidement établi de notre étude des sélectivités à la phase et à la direction est l'absence de corrélation forte entre ces différents types de sélectivités au sein de la couche II/III du cortex. Ce résultat est nouveau à plusieurs égards. Tout d'abord il décrit les propriétés des neurones de la couche II/III qui n'avaient pas été explorées dans l'étude d'Estebanez et al. Ensuite il s'applique aux liens qui peuvent (ou ne peuvent pas) être établis entre les sélectivités à la phase et les sélectivités à la direction lorsque que ces dernières sont définies à l'aide des vecteurs V1 et V2 appliqués sur les deux axes rostro-caudal et dorso-ventral. Quand les sélectivités à la direction sont mesurées avec des

stimuli « traditionnels » (typiquement des Diracs ou des rampes), vitesse et position sont inévitablement appliquées simultanément dans la même direction et il est impossible de distinguer au moment de l'analyse la contribution du paramètre vitesse ou celle du paramètre position. L'originalité de notre étude réside entre autre dans notre capacité de ségréger l'effet de ces deux paramètres : nous montrons par exemple que préférence directionnelle en position (i.e. pour la phase 2) et en vitesse (i.e. pour la phase 1) ne sont pas corrélées l'une avec l'autre. Nos résultats vont encore plus loin et montre aussi qu'il en va de même pour toutes les sélectivités entre phases, entre directions ou entre phases et directions.

Ce dernier aspect, c'est-à-dire qu'une sélectivité en phase n'a pas de lien commun avec une sélectivité en direction, est particulièrement intéressant. Il n'est en effet pas garanti a priori. Pour le calcul de la sélectivité à la direction pour des stimuli construits à partir de V1 par exemple, 4 conditions de nos stimulations sont utilisées (V1 sur l'axe R-C, V1 sur l'axe D-V, -V1 sur l'axe R-C et -V1 sur l'axe D-V). Et pour le calcul de la sélectivité à la phase pour des stimuli appliqués selon l'axe rostro-caudal, 4 conditions sont aussi utilisées dont 2 qui recourent celles que nous venons d'évoquer ci-dessus (explicitement : V1 et -V1 sur l'axe R-C, les 2 autres conditions étant V2 et -V2 sur l'axe R-C). Le fait de partager ainsi certaines conditions qui rentrent dans les deux calculs est susceptible d'introduire des corrélations « par construction ». Par exemple, si une majorité de cellules répondent uniquement au stimulus V1 dans l'axe R-C, à la fois leur direction préférentielle et leur phase préférentielle mentionnées ci-dessus seront fortement influencées par cette réponse et l'on calculera une corrélation non nulle entre sélectivité à la phase et à la direction. Mais au-delà de cette corrélation intrinsèque entre ces sélectivités, il apparaît pourtant clair que phase et direction mesurent des caractéristiques physiquement différentes (une phase se mesure sur un seul axe alors qu'une direction nécessite de déplacer la vibrisse à 2D) et ne peuvent pas être intégralement corrélées. C'est donc ce que notre étude démontre solidement. Notons enfin que cette indépendance phase-direction avait aussi été observée par Estebanez et al. en couches IV/V dans le cadre d'une comparaison entre sélectivité directionnelle mesurée avec des stimuli « traditionnels » et sélectivité à la phase mesurée avec des combinaisons linéaires de V1 et V2.

Dans la mesure où la sélectivité à la phase et la sélectivité à la direction de la déflexion de la vibrisse sont deux caractéristiques indépendantes de la stimulation, on peut se demander quel pourrait être l'utilité de ces deux dimensions de codage d'un point de vue comportemental. On pourrait proposer par exemple que le paramètre direction coderait pour la direction d'un mouvement des vibrisses permettant la détection des contours d'un objet saillant ou du sens de déplacement d'un objet par rapport au repère de la tête de l'animal. En ce qui concerne la phase, il est intéressant de remarquer que les filtres élémentaires V1 et V2 identifiés dans le papier d'Estebanez et al sont très similaires à des événements élémentaires observées lors du mouvement d'une vibrisse contre une texture (transitoires oscillants rapides lors de frottement de type « stick-slip »)

(Boubenec, Shulz et al. 2012). Par conséquent, ces filtres pourraient d'avantage être impliqués dans l'identification de la texture d'un objet.

Nos expériences permettent d'obtenir une ébauche de cartographie fonctionnelle pour les différents paramètres étudiés. Les résultats qui semblent émerger de notre étude sont les suivants. Concernant les préférences directionnelles pour des stimulations mono-vibrissales (stimulations décorréelées), une carte pour le vecteur vitesse (V_1) pourrait être présente à l'intérieur du tonneau. Cette représentation de la vitesse serait similaire à celle observée par Kremer et al. et Andermann et al. pour des stimulations « classiques » de type rampes comportant également une composante position, pour laquelle nous n'observons pas de représentation particulière (V_2).

Cette partie de mon travail reste préliminaire compte tenu de l'échantillon statistique trop faible. En effet, étudier la représentation de la phase et de la direction est beaucoup plus difficile que dans le cas de l'étude global/local. En effet, les mêmes données sont séparées en uniquement 2 cas pour le cas global / local (stimulations corrélées vs. stimulations non corrélées) tandis qu'elles sont divisées en 16 dans le second cas (2 phases, 4 directions, corrélés et non corrélés). Par conséquent l'échantillonnage statistique de chaque paramètre (par exemple une direction) est intrinsèquement plus faible que pour le cas global vs. local. En outre, les sélectivités à la phase et la à la direction sont mesurées seulement en 4 points ((0° , 90° , 180° , 270°) et (V_1 , V_2 , $-V_1$, $-V_2$)), ce qui rend également peu précis la mesure des angles préférentiels et des phases préférentiels. Par conséquent cette analyse est rendue compliquée par le nombre élevé de dimensions impliquées et le nombre fini de stimulations qui peuvent être présentées pour un champ donné.

Notons qu'une manière de réduire l'espace des paramètres serait d'utiliser à l'avenir une stimulation plus adaptée aux cellules locales, en présentant un contraste de déflexion angulaire entre la vibrisse principale et son contour (Estebanez et al, 2012). Ceci nécessitera une localisation préalable précise des tonneaux (imagerie intrinsèque, flexMEA...) et permettrait d'augmenter le taux de réponse des cellules locales lors de la présentation des stimulations en phase et en direction de la vibrisse principale.

L'étude des stimulations corrélées reflétant l'aspect multi vibrissal semble indiquer l'émergence potentielle d'un « supra pinwheel » à l'échelle du cortex à tonneaux complet et ce en particulier pour le vecteur position. Ces résultats sont très préliminaires et devront être confirmés. On peut rapprocher cette observation du travail de Jacob et al. sur la sélectivité à la direction d'un mouvement global apparent (Jacob et al, 2008). Dans ce travail, l'existence d'une sélectivité à la direction d'un mouvement apparent des vibrisses (différente de la sélectivité à la direction du mouvement local) avait été démontrée. D'autre part, dans ce travail, l'angle préférentiel d'un neurone pour ce mouvement apparent était corrélé à l'asymétrie de son champ récepteur. Si on extrapole ces observations en disant que des neurones appartenant aux tonneaux en bordure de S1bf

auront en moyenne des champs récepteurs très asymétriques et que des neurones appartenant aux tonneaux centraux auront des champs récepteurs plus symétriques, on peut imaginer que la sélectivité à des mouvements apparents soit aussi organisée en un supra pinwheel à l'échelle de S1bf. Des expériences de microscopie à deux photons comme celles présentées ici et faites à des positions éloignées dans S1bf, éventuellement sur le même animal pour limiter l'effet des variabilités inter-animaux, permettront sans doute de confirmer ces observations. L'utilisation de techniques de microscopie à grande champ comme l'imagerie de sondes potentiels ou de la microscopie à deux photons fibrées pour explorer 2 positions éloignées, permettrait sans doute de faciliter également cette étude. Elles sont d'ailleurs en cours dans le laboratoire de Daniel Shulz.

III.4.4 Analyses possibles

Nos données incluent encore d'autres voies d'explorations.

Dans notre étude sur le lien entre sélectivité à la phase et à la direction, nous nous sommes concentrés sur l'effet de la phase sur la sélectivité directionnelle. Or l'étude symétrique observant l'effet de la direction sur la carte des phases serait tout aussi intéressante.

Dans nos études de cartographie liée à la phase ou à la direction, nous avons également regroupé les cellules locales et globales, sans distinction. Or notre étude a démontré une ségrégation importante des cellules du point de vue spatial en fonction de leur comportement local ou global. Il serait intéressant de regarder la corrélation des réponses à la phase ou à la direction au sein d'un cluster de cellules globales ou locales et d'étudier si les cartographies sont fondamentalement modifiées en dissociant les sous catégories locales et globales.

Enfin, l'espace des paramètres utilisés pour les stimulations ayant été réduit à deux phases et quatre directions ce qui n'est pas suffisant en termes de phases explorées pour aborder la question du caractère simple ou complexe des cellules enregistrées. Pourtant l'éventuelle organisation spatiale des cellules simples et complexes en couche II/III apparaît comme un point important pour la compréhension des mécanismes de codage de l'information sensorielle. Une nouvelle étude avec un espace des phases explorées enrichies (au moins huit phases) permettrait d'aborder ce point.

Conclusion

Mon travail de thèse articulé autour de la question de l'intégration multi vibrissale dans le cortex somato sensoriel chez le rat s'est partagé principalement en deux chapitres, l'un abordant la question de neurosciences à proprement parler, l'autre traitant de l'ensemble des développements optiques nécessaires à la réalisation d'un montage permettant de répondre à la question posée.

J'ai donc développé un montage de microscopie à deux photons original capable d'enregistrer l'activité neuronale en couche II/III du cortex tout en donnant accès à l'architecture des réseaux enregistrés. Ce microscope permet de détecter à haute cadence des signaux calciques individuels tout en nécessitant une puissance modérée de laser d'excitation ce qui limite la photo toxicité et le photo blanchiment. J'ai par ailleurs identifié quantitativement les différentes sources de bruits lors des enregistrements *in vivo* et mis en œuvre des solutions *ad hoc* (système de contention, algorithme de recalage des images...) pour réduire ou corriger ces bruits afin de n'être plus limité que par le bruit de photon. Enfin, j'ai estimé la qualité des enregistrements des cellules individuelles en excluant tout risque de contamination violente par des signaux collectifs tels que ceux provenant du neuropil.

A l'aide de ce microscope, j'ai montré qu'il existe en couches II/III une ségrégation cellulaire selon un comportement globale ou local et que cette ségrégation s'articule au-dessus de l'organisation des tonneaux en couche IV, les cellules globales présentant une densité plus forte au-dessus des septa tandis que les cellules locales sont plus représentées au-dessus des tonneaux. Par ailleurs, au sein de la couche II/III du cortex j'ai mis en évidence l'absence de corrélation forte entre les sélectivités à la phase et à la direction et posé les bases d'une étude de l'organisation spatiale de ces différentes sélectivités avec l'ébauche d'une cartographie fonctionnelle.

Bibliographie

- Ahl, A. S. (1986). "The role of vibrissae in behavior: a status review." Vet Res Commun **10**(4): 245-268.
- Andermann, M. L. and C. I. Moore (2006). "A somatotopic map of vibrissa motion direction within a barrel column." Nat Neurosci **9**(4): 543-551.
- Arabzadeh, E., E. Zorzin, et al. (2005). "Neuronal encoding of texture in the whisker sensory pathway." PLoS Biol **3**(1): e17.
- Armstrong-James, M. and C. A. Callahan (1991). "Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neurones." J Comp Neurol. 1991 Jan 8;303(2):211-24.
- Armstrong-James, M. and K. Fox (1987). "Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex." J Comp Neurol. 1987 Sep 8;263(2):265-81.
- Armstrong-James, M. A. (1995). "The nature and plasticity of sensory processing within adult rat barrel cortex." Cerebral Cortex **11**: 333-374.
- Atzori, M., S. Lei, et al. (2001). "Differential synaptic processing separates stationary from transient inputs to the auditory cortex." Nat Neurosci **4**(12): 1230-1237.
- Bandyopadhyay, S., S. A. Shamma, et al. (2010). "Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex." Nat Neurosci **13**(3): 361-368.
- Beaurepaire, E. and J. Mertz (2002). "Epifluorescence collection in two-photon microscopy." Appl Opt **41**(25): 5376-5382.
- Benninger, R. K., W. J. Ashby, et al. (2008). "Single-photon-counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy." Opt Lett **33**(24): 2895-2897.
- Boubenec, Y., D. E. Shulz, et al. (2012). "Whisker encoding of mechanical events during active tactile exploration." Front Behav Neurosci **6**: 74.
- Brecht, M. (2007). "Barrel cortex and whisker-mediated behaviors." Curr Opin Neurobiol **17**(4): 408-416.
- Brecht, M., B. Preilowski, et al. (1997). "Functional architecture of the mystacial vibrissae." Behav Brain Res **84**(1-2): 81-97.
- Brecht, M. and B. Sakmann (2002). "Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex." J Physiol **543**(Pt 1): 49-70.
- Brumberg, J. C., D. J. Pinto, et al. (1996). "Spatial gradients and inhibitory summation in the rat whisker barrel system." J Neurophysiol **76**(1): 130-140.
- Bruno, R. M., V. Khatri, et al. (2003). "Thalamocortical angular tuning domains within individual barrels of rat somatosensory cortex." J Neurosci **23**(29): 9565-9574.
- Bureau, I., F. von Saint Paul, et al. (2006). "Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex." PLoS Biol **4**(12): e382.
- Carvell, G. E. and D. J. Simons (1990). "Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat." J Neurosci **10**(8): 2638-2648.
- Carvell, G. E. and D. J. Simons (1995). "Task- and subject-related differences in sensorymotor behavior during active touch." Somatosens Mot Res **12**(1),1-9.

- Celikel, T. and B. Sakmann (2007). "Sensory integration across space and in time for decision making in the somatosensory system of rodents." Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 23;104(4):1395-400. Epub 2007 Jan 16.
- Chapin, J. K. and C. S. Lin (1984). "Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats." J Comp Neurol **229**(2): 199-213.
- Chiaia, N. L., R. W. Rhoades, et al. (1991). "Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei." J Comp Neurol **314**(2): 201-216.
- Chiaia, N. L., S. Zhang, et al. (2000). "Effects of neonatal axoplasmic transport attenuation on the response properties of vibrissae-sensitive neurons in the trigeminal principal sensory nucleus of the rat." Somatosens Mot Res **17**(3): 273-283.
- Chin, H. (1998). "Molecular biology of neuronal voltage-gated calcium channels." Exp Mol Med **30**(3): 123-130.
- Crochet, S., J. F. Poulet, et al. (2011). "Synaptic mechanisms underlying sparse coding of active touch." Neuron **69**(6): 1160-1175.
- de Grauw, C. J., J. M. Vroom, et al. (1999). "Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens." Appl Opt **38**(28): 5995-6003.
- Diamond, A. (1990). "The development and neural bases of higher cognitive functions. Introduction." Ann N Y Acad Sci **608**: xiii-lvi.
- Diamond, M. E. (1995). "Somatosensory thalamus of the rat." The Barrel Cortex of Rodents **11**, pp.189-219.
- Diamond, M. E., M. Armstrong-James, et al. (1992). "Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus." The Journal of Comparative Neurology **318**(4): 462-476.
- Diamond, M. E., M. von Heimendahl, et al. (2008). Response to: Ritt et al., "embodied information processing: vibrissa mechanics and texture features shape micromotions in actively sensing rats." Neuron **57**, 599-613, Neuron. 2008 Dec 10;60(5):743-4; author reply 745-7.
- Dombeck, D. A., A. N. Khabbaz, et al. (2007). "Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice." Neuron **56**(1): 43-57.
- Dong, C. Y., K. Koenig, et al. (2003). "Characterizing point spread functions of two-photon fluorescence microscopy in turbid medium." J Biomed Opt **8**(3): 450-459.
- Drew, P. J. and D. E. Feldman (2007). "Representation of Moving Wavefronts of Whisker Deflection in Rat Somatosensory Cortex." Journal of Neurophysiology **98**(3): 1566-1580.
- Driscoll, J. D., A. Y. Shih, et al. (2011). "Photon counting, censor corrections, and lifetime imaging for improved detection in two-photon microscopy." J Neurophysiol **105**(6): 3106-3113.
- Dunn, A. K., V. P. Wallace, et al. (2000). "Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples." Appl Opt **39**(7): 1194-1201.
- Dykes, R. W. (1975). "Afferent fibers from mystacial vibrissae of cats and seals." J Neurophysiol **38**(3): 650-662.
- Egger, V., D. Feldmeyer, et al. (1999). "Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex." Nat Neurosci **2**(12): 1098-1105.
- Ego-Stengel, V., J. Le Cam, et al. (2012). "Coding of apparent motion in the thalamic nucleus of the rat vibrissal somatosensory system." J Neurosci **32**(10): 3339-3351.

- Ego-Stengel, V., T. Mello e Souza, et al. (2005). "Spatiotemporal characteristics of neuronal sensory integration in the barrel cortex of the rat." J Neurophysiol **93**(3): 1450-1467.
- Estebanez, L., S. E. Boustani, et al. (2012). "Correlated input reveals coexisting coding schemes in a sensory cortex." Nat Neurosci.
- Fan, G. Y., H. Fujisaki, et al. (1999). "Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons." Biophys J **76**(5): 2412-2420.
- Feldmeyer, D., V. Egger, et al. (1999). "Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex." J Physiol **521 Pt 1**: 169-190.
- Feldmeyer, D., J. Lubke, et al. (2002). "Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column." J Physiol **538**(Pt 3): 803-822.
- Fisher, N. I. (1993). "Statistical Analysis of Circular data." Cambridge University Press.
- Fox, K. (2008). "Barrel Cortex." N.Y. Cambridge, Ed.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2001). "Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8." Science **294**(5544): 1071-1074.
- Furuta, T., N. Urbain, et al. (2010). "Corticofugal control of vibrissa-sensitive neurons in the interpolaris nucleus of the trigeminal complex." J Neurosci **30**(5): 1832-1838.
- Gamzu, E. and E. Ahissar (2001). "Importance of temporal cues for tactile spatial-frequency discrimination." J Neurosci **21**(18): 7416-7427.
- Ghazanfar, A. A. and M. A. Nicolelis (1997). "Nonlinear processing of tactile information in the thalamocortical loop." J Neurophysiol **78**(1): 506-510.
- Ghazanfar, A. A. and M. A. Nicolelis (1999). "Spatiotemporal properties of layer V neurons of the rat primary somatosensory cortex." Cereb Cortex **9**(4): 348-361.
- Gibson, J. M. and W. I. Welker (1983). "Quantitative studies of stimulus coding in first-order vibrissa afferents of rats. 1. Receptive field properties and threshold distributions." Somatosens Res **1**(1): 51-67.
- Glazewski, S., M. McKenna, et al. (1998). "Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex." Eur J Neurosci **10**(6): 2107-2116.
- Gobel, W. and F. Helmchen (2007). "In vivo calcium imaging of neural network function." Physiology (Bethesda) **22**: 358-365.
- Gobel, W., B. M. Kampa, et al. (2007). "Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning." Nat Methods **4**(1): 73-79.
- Goldreich, D., B. E. Peterson, et al. (1998). "Optical imaging and electrophysiology of rat barrel cortex. II. Responses to paired-vibrissa deflections." Cereb Cortex **8**(2): 184-192.
- Göppert-Mayer, M. (1931). "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen." Annalen der Physik **401**(3): 273-294.
- Haidarliu, S., E. Simony, et al. (2010). "Muscle architecture in the mystacial pad of the rat." Anat Rec (Hoboken) **293**(7): 1192-1206.
- Hartmann, M. J., N. J. Johnson, et al. (2003). "Mechanical characteristics of rat vibrissae: resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awake behaving animal." J Neurosci **23**(16): 6510-6519.
- Harvey, M. A., R. N. Sachdev, et al. (2001). "Cortical barrel field ablation and unconditioned whisking kinematics." Somatosens Mot Res. **2001**;18(3):223-7.
- Helmchen, F. and W. Denk (2005). "Deep tissue two-photon microscopy." Nat Meth **2**(12): 932-940.

- Helmchen, F. and T. Nevian (2007). "Little strokes fill big oaks: a simple in vivo stain of brain cells." Neuron. 2007 Mar 15;53(6):771-3.
- Helmchen, F. and D. W. Tank (2011). "A single compartment model of calcium dynamics in dendrites and nerve terminals." Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual.
- Hill, D. N., R. Bermejo, et al. (2008). "Biomechanics of the vibrissa motor plant in rat: rhythmic whisking consists of triphasic neuromuscular activity." J Neurosci **28**(13): 3438-3455.
- Hoeflinger, B. F., C. A. Bennett-Clarke, et al. (1995). "Patterning of local intracortical projections within the vibrissae representation of rat primary somatosensory cortex." J Comp Neurol **354**(4): 551-563.
- Hutson, K. A. and R. B. Masterton (1986). "The sensory contribution of a single vibrissa's cortical barrel." J Neurophysiol **56**(4): 1196-1223.
- Ibrahim, L. and E. A. Wright (1975). "The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions." J Embryol Exp Morphol **33**(4): 831-844.
- Jacob, V., L. Estebanez, et al. (2010). "The Matrix: a new tool for probing the whisker-to-barrel system with natural stimuli." J Neurosci Methods **189**(1): 65-74.
- Jacob, V., J. Le Cam, et al. (2008). "Emergent properties of tactile scenes selectively activate barrel cortex neurons." Neuron **60**(6): 1112-1125.
- Jacquin, M. F., R. A. Stennett, et al. (1988). "Structure-function relationships in the rat brainstem subnucleus interpolaris: II. Low and high threshold trigeminal primary afferents." J Comp Neurol **267**(1): 107-130.
- Jacquin, M. F., M. R. Wiegand, et al. (1990). "Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interpolaris. VIII. Cortical inputs." J Neurophysiol **64**(1): 3-27.
- Keller, A. (1995). "Synaptic organization of the barrel cortex." The Barrel Cortex of Rodents **11**,pp.221-262.
- Kerr, J. N., C. P. de Kock, et al. (2007). "Spatial organization of neuronal population responses in layer 2/3 of rat barrel cortex." J Neurosci **27**(48): 13316-13328.
- Kerr, J. N., D. Greenberg, et al. (2005). "Imaging input and output of neocortical networks in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):14063-8. Epub 2005 Sep 12.
- Kerr, J. N., D. Greenberg, et al. (2005). "Imaging input and output of neocortical networks in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14063-14068.
- Kerr, J. N. D. and W. Denk (2008). "Imaging in vivo: watching the brain in action." Nat Rev Neurosci **9**(3): 195-205.
- Kida, H., S. Shimegi, et al. (2005). "Similarity of direction tuning among responses to stimulation of different whiskers in neurons of rat barrel cortex." J Neurophysiol **94**(3): 2004-2018.
- Kim, K. H., C. Buehler, et al. (2007). "Multifocal multiphoton microscopy based on multianode photomultiplier tubes." Opt Express **15**(18): 11658-11678.
- Knutsen, P. M., A. Biess, et al. (2008). "Vibrissal kinematics in 3D: tight coupling of azimuth, elevation, and torsion across different whisking modes." Neuron **59**(1): 35-42.
- Kremer, Y., J. F. Leger, et al. (2011). "Late emergence of the vibrissa direction selectivity map in the rat barrel cortex." J Neurosci **31**(29): 10689-10700.
- Krupa, D. J., M. S. Matell, et al. (2001). "Behavioral properties of the trigeminal somatosensory system in rats performing whisker-dependent tactile discriminations." J Neurosci **21**(15): 5752-5763.
- Kurtz, R., M. Fricke, et al. (2006). "Application of multiline two-photon microscopy to functional in vivo imaging." J Neurosci Methods **151**(2): 276-286.

- Land, P. W. and D. J. Simons (1985). "Cytochrome oxidase staining in the rat SmI barrel cortex." J Comp Neurol **238**(2): 225-235.
- Le Cam, J., L. Estebanez, et al. (2011). "Spatial structure of multiwhisker receptive fields in the barrel cortex is stimulus dependent." J Neurophysiol **106**(2): 986-998.
- Lichtenstein, S. H., G. E. Carvell, et al. (1990). "Responses of rat trigeminal ganglion neurons to movements of vibrissae in different directions." Somatosens Mot Res **7**(1): 47-65.
- Lubke, J., V. Egger, et al. (2000). "Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex." J Neurosci **20**(14): 5300-5311.
- Lütcke, H. and F. Helmchen (2011). "Two-photon imaging and analysis of neural network dynamics" Rep. Prog. Phys. **74**(8).
- Ma, W. J., J. M. Beck, et al. (2006). "Bayesian inference with probabilistic population codes." Nat Neurosci **9**(11): 1432-1438.
- Margolis, D. J., H. Lütcke, et al. (2012). "Reorganization of cortical population activity imaged throughout long-term sensory deprivation." Nat Neurosci **15**(11): 1539-1546.
- Markram, H. (1997). "A network of tufted layer 5 pyramidal neurons." Cereb Cortex **7**(6): 523-533.
- Meyer, H. S., V. C. Wimmer, et al. (2010). "Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex." Cereb Cortex **20**(10): 2287-2303.
- Minnery, B. S., R. M. Bruno, et al. (2003). "Response transformation and receptive-field synthesis in the lemniscal trigeminothalamic circuit." J Neurophysiol **90**(3): 1556-1570.
- Minnery, B. S. and D. J. Simons (2003). "Response Properties of Whisker-Associated Trigeminothalamic Neurons in Rat Nucleus Principalis." Journal of Neurophysiology **89**(1): 40-56.
- Mittmann, W., D. J. Wallace, et al. (2011). "Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo." Nat Neurosci **14**(8): 1089-1093.
- Moore, C. I. and S. B. Nelson (1998). "Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex." J Neurophysiol **80**(6): 2882-2892.
- Mountcastle, V. B. (1957). "Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex." J Neurophysiol. 1957 Jul;20(4):408-34.
- Mountcastle, V. B. (1997). "The columnar organization of the neocortex." Brain. 1997 Apr;120 (Pt 4):701-22.
- Müller, J. W. (1973). "Dead-Time Problems." Nuclear Instruments and Methods **112**: 43-57.
- Nagayama, S., S. Zeng, et al. (2007). "In vivo simultaneous tracing and Ca(2+) imaging of local neuronal circuits." Neuron **53**(6): 789-803.
- Nauhaus, I., A. Benucci, et al. (2008). "Neuronal selectivity and local map structure in visual cortex." Neuron **57**(5): 673-679.
- Nguyen, Q. T., N. Callamaras, et al. (2001). "Construction of a two-photon microscope for video-rate Ca(2+) imaging." Cell Calcium **30**(6): 383-393.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al. (2004). "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo." Nat Methods **1**(1): 31-37.
- O'Donovan, M. J., S. Ho, et al. (1993). "Real-time imaging of neurons retrogradely and anterogradely labelled with calcium-sensitive dyes." J Neurosci Methods **46**(2): 91-106.

- Oheim, M., E. Beaupaire, et al. (2001). "Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth." J Neurosci Methods **111**(1): 29-37.
- Ohki, K., S. Chung, et al. (2005). "Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex." Nature **433**(7026): 597-603.
- Ohki, K., S. Chung, et al. (2005). "Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex." Nature. 2005 Feb 10;433(7026):597-603. Epub 2005 Jan 19.
- Ohki, K., S. Chung, et al. (2006). "Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels." Nature **442**(7105): 925-928.
- Ohki, K. and R. C. Reid (2007). "Specificity and randomness in the visual cortex." Curr Opin Neurobiol **17**(4): 401-407.
- Ohsaki, K., N. Osumi, et al. (2002). "Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels." Brain Res Dev Brain Res **137**(2): 159-170.
- Peng, H., Z. Ruan, et al. (2010). "V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets." Nat Biotechnol **28**(4): 348-353.
- Petersen, C. C. (2003). "The barrel cortex--integrating molecular, cellular and systems physiology." Pflugers Arch **447**(2): 126-134.
- Petersen, C. C., M. Brecht, et al. (2004). "Synaptic changes in layer 2/3 underlying map plasticity of developing barrel cortex." Science **304**(5671): 739-742.
- Petersen, C. C. and B. Sakmann (2000). "The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex." J Neurosci **20**(20): 7579-7586.
- Petersen, C. C. and B. Sakmann (2001). "Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging." J Neurosci **21**(21): 8435-8446.
- Petersen, C. C. H. and B. Sakmann (2001). "Functionally Independent Columns of Rat Somatosensory Barrel Cortex Revealed with Voltage-Sensitive Dye Imaging." The Journal of Neuroscience **21**(21): 8435-8446.
- Pierret, T., P. Lavalley, et al. (2000). "Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids." J Neurosci **20**(19): 7455-7462.
- Polley, D. B., C. H. Chen-Bee, et al. (1999). "Two directions of plasticity in the sensory-deprived adult cortex." Neuron **24**(3): 623-637.
- Prevost, A., J. Scheibert, et al. (2009). "Effect of fingerprints orientation on skin vibrations during tactile exploration of textured surfaces." Commun Integr Biol **2**(5): 422-424.
- Puccini, G. D., A. Compte, et al. (2006). "Stimulus dependence of barrel cortex directional selectivity." PLoS One **1**: e137.
- Reddy, G. D. and P. Saggau (2005). "Fast three-dimensional laser scanning scheme using acousto-optic deflectors." J Biomed Opt **10**(6): 064038.
- Reyes, A. and B. Sakmann (1999). "Developmental Switch in the Short-Term Modification of Unitary EPSPs Evoked in Layer 2/3 and Layer 5 Pyramidal Neurons of Rat Neocortex." The Journal of Neuroscience **19**(10): 3827-3835.
- Rice, F. L., B. T. Fundin, et al. (1997). "Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat." J Comp Neurol **385**(2): 149-184.
- Rice, F. L., A. Mance, et al. (1986). "A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes." J Comp Neurol **252**(2): 154-174.
- Rodgers, K. M., A. M. Benison, et al. (2006). "Two-dimensional coincidence detection in the vibrissa/barrel field." J Neurophysiol **96**(4): 1981-1990.

- Rothschild, G., I. Nelken, et al. (2010). "Functional organization and population dynamics in the mouse primary auditory cortex." *Nat Neurosci* **13**(3): 353-360.
- Sachdev, R. N., H. Sellien, et al. (2001). "Temporal organization of multi-whisker contact in rats." *Somatosens Mot Res* **18**(2): 91-100.
- Salome, R., Y. Kremer, et al. (2006). "Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors." *J Neurosci Methods* **154**(1-2): 161-174.
- Sanchez-Vives, M. V. and D. A. McCormick (2000). "Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex." *Nat Neurosci* **3**(10): 1027-1034.
- Sato, T. R., N. W. Gray, et al. (2007). "The functional microarchitecture of the mouse barrel cortex." *PLoS Biol* **5**(7): e189.
- Sawinski, J., D. J. Wallace, et al. (2009). "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(46): 19557-19562.
- Scheibert, J., S. Leurent, et al. (2009). "The role of fingerprints in the coding of tactile information probed with a biomimetic sensor." *Science* **323**(5920): 1503-1506.
- Shimegi, S., T. Akasaki, et al. (2000). "Physiological and anatomical organization of multiwhisker response interactions in the barrel cortex of rats." *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6241-8.
- Shimegi, S., T. Ichikawa, et al. (1999). "Temporal characteristics of response integration evoked by multiple whisker stimulations in the barrel cortex of rats." *J Neurosci* **19**(22): 10164-10175.
- Simons, D. J. (1978). "Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex." *J Neurophysiol* **41**(3): 798-820.
- Simons, D. J. (1985). "Temporal and spatial integration in the rat SI vibrissa cortex." *J Neurophysiol* **54**(3): 615-635.
- Simons, D. J. (1995). "Neuronal integration in the somatosensory whisker/barrel cortex." *The Barrel Cortex of Rodents* **11**,pp.263-297.
- Simons, D. J. and G. E. Carvell (1989). "Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system." *J Neurophysiol* **61**(2): 311-330.
- Simons, D. J. and T. A. Woolsey (1979). "Functional organization in mouse barrel cortex." *Brain Res* **165**(2): 327-332.
- Smetters, D., A. Majewska, et al. (1999). "Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging." *Methods* **18**(2): 215-221.
- Sosnik, R., S. Haidarliu, et al. (2001). "Temporal frequency of whisker movement. I. Representations in brain stem and thalamus." *J Neurophysiol* **86**(1): 339-353.
- Staiger, J. F., I. Flagmeyer, et al. (2004). "Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells." *Cereb Cortex* **14**(6): 690-701.
- Stosiek, C., O. Garaschuk, et al. (2003). "In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7319-24. Epub 2003 May 30.
- Svoboda, K., W. Denk, et al. (1997). "In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons." *Nature* **385**(6612): 161-165.
- Szwed, M., K. Bagdasarian, et al. (2003). "Encoding of vibrissal active touch." *Neuron* **40**(3): 621-630.
- Tan, Y. P., I. Llano, et al. (1999). "Fast scanning and efficient photodetection in a simple two-photon microscope." *J Neurosci Methods* **92**(1-2): 123-135.
- Timofeeva, E., C. Merette, et al. (2003). "A map of angular tuning preference in thalamic barreloids." *J Neurosci* **23**(33): 10717-10723.

- Urbain, N. and M. Deschenes (2007). "A new thalamic pathway of vibrissal information modulated by the motor cortex." *J Neurosci* **27**(45): 12407-12412.
- Urbain, N. and M. Deschenes. (2009). "Scholarpedia 4(5):7454. http://www.scholarpedia.org/article/Vibrissal_afferents_from_trigeminal_nucleus."
- Van der Loos, H., E. Welker, et al. (1986). "Selective breeding for variations in patterns of mystacial vibrissae of mice. Bilaterally symmetrical strains derived from ICR stock." *J Hered.* 1986 Mar-Apr;77(2):66-82.
- Van der Loos, H. and T. A. Woolsey (1973). "Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs." *Science (New York, N.Y.)* **179**(4071): 395-398.
- Vanderhaeghen, P., Q. Lu, et al. (2000). "A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex." *Nat Neurosci* **3**(4): 358-365.
- Veinante, P. and M. Deschenes (1999). "Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat." *J Neurosci* **19**(12): 5085-5095.
- Vincent, S. B. (1912). *The function of the vibrissae in the behavior of the white rat*, Cambridge [Mass.] Holt.
- Wang, Y., M. Toledo-Rodriguez, et al. (2004). "Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat." *J Physiol* **561**(Pt 1): 65-90.
- Waters, J. and F. Helmchen (2006). "Background synaptic activity is sparse in neocortex." *J Neurosci.* 2006 Aug 9;26(32):8267-77.
- Weiss, J. L. and R. D. Burgoyne (2002). "Sense and sensibility in the regulation of voltage-gated Ca(2+) channels." *Trends Neurosci* **25**(10): 489-491.
- Welker, C. (1971). "Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (Sml) cerebral neocortex in albino rat." *Brain Res.* 1971 Mar 5;26(2):259-75.
- Welker, W. I., J. I. Johnson, Jr., et al. (1964). "Some Morphological and Physiological Characteristics of the Somatic Sensory System in Raccoons." *Am Zool* **4**: 75-94.
- Wier, W. G., C. W. Balke, et al. (2000). "A custom confocal and two-photon digital laser scanning microscope." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(6): H2150-2156.
- Wilent, W. B. and D. Contreras (2005). "Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex." *Nat Neurosci* **8**(10): 1364-1370.
- Wimmer, V. C., R. M. Bruno, et al. (2010). "Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POM axons in rat vibrissal cortex." *Cereb Cortex* **20**(10): 2265-2276.
- Woolsey, T. A. and H. Van der Loos (1970). "The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units." *Brain Res* **17**(2): 205-242.
- Yu, C., D. Derdikman, et al. (2006). "Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat." *PLoS Biol* **4**(5): e124.
- Zhu, J. J. and B. W. Connors (1999). "Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex." *J Neurophysiol.* 1999 Mar;81(3):1171-83.
- Zhu, J. J. and B. W. Connors (1999). "Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex." *J Neurophysiol* **81**(3): 1171-1183.

- Zipfel, W. R., R. M. Williams, et al. (2003). "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences." Nat Biotechnol **21**(11): 1369-1377.
- Zucker, E. and W. I. Welker (1969). "Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion." Brain Res **12**(1): 138-156.