



HAL
open science

Rôle de la connectivité intracorticale dans le traitement des informations sensorielles

Michael Quiquempoix

► **To cite this version:**

Michael Quiquempoix. Rôle de la connectivité intracorticale dans le traitement des informations sensorielles. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066181 . tel-02162632

HAL Id: tel-02162632

<https://theses.hal.science/tel-02162632>

Submitted on 22 Jun 2019

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale n°158 (3C)

Laboratoire Neurosciences Paris Seine / Equipe de recherche Réseaux de Neurones et Rythmes Physiopathologiques

Rôle de la connectivité intracorticale dans le traitement des informations sensorielles

Par Michael QUIQUEMPOIX

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Régis LAMBERT

Présentée et soutenue publiquement le 20/06/2017

Devant un jury composé de :

Dr. Frédéric CHAVANE	Rapporteur
Dr. Roustem KHAZIPOV	Rapporteur
Dr. Ingrid BUREAU	Examinatrice
Pr. Stéphane CHARPIER	Examinateur
Dr. Thomas BESSAIH	Co-encadrant de thèse
Pr. Régis LAMBERT	Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Hervé Chneiweiss qui m'a ouvert les portes de son laboratoire Neurosciences Paris Seine et qui m'a permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions de travail.

Je remercie vivement Frédéric Chavane et Roustem Khazipov d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'Ingrid Bureau et Stéphane Charpier pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger mon travail.

Merci à Régis Lambert mon directeur de thèse et Nathalie Leresche, co-chefs d'équipe. Vous m'avez accueilli dans votre équipe en M2 et m'avez soutenu et poussé à donner le meilleur de moi-même jusqu'à la fin. Merci pour votre regard critique et constructif sur mon travail. Merci Nathalie pour toute ton expérience et ton savoir, tu m'as énormément appris non seulement scientifiquement mais également sur le fonctionnement de la recherche académique. Merci Régis d'avoir essayé de m'inculquer un esprit de synthèse, ta manière de réfléchir sur n'importe quel sujet scientifique m'inspire énormément. Toujours très pragmatique et presque algorithmique dans tes analyses, j'aimerais pouvoir un jour jouir de la même sagacité et vivacité d'esprit.

Un grand merci à Thomas Bessaih, qui m'encadre depuis le M2. Tous les sacrifices que tu as faits, toutes les décisions que tu as prises ... tout cela n'avait qu'un seul objectif : que je réussisse au mieux. Nous avons passé de nombreuses, que dis-je de très nombreuses heures à parler Science. Tu as essayé de me transmettre toute ta culture, tout ton savoir technique et théorique, sans aucune retenue. Tu m'as formé à l'électrophysiologie et je te dois beaucoup. Merci pour ta confiance et merci d'avoir misé sur moi.

Je remercie Katia Boutourlinski avec qui j'ai pu apprendre énormément et sans qui mon travail de thèse n'aurait pu voir le jour ! Merci pour l'oreille attentive que tu as su me tendre quand c'était nécessaire. Bien entendu un grand merci à Sophie, avec qui j'ai apprécié travailler et qui m'a énormément aidé dans l'aboutissement de ce travail. Merci à Marco et Sarah qui nous ont rejoints récemment merci pour votre bonne humeur, et merci Marco de

nous avoir ramené un peu de soleil d'Italie ! Je pense que t'entendre râler en italien pendant tes expériences me manquera énormément !!!

Je tiens à remercier tout particulièrement Patricia Reynaud-Bouret, grâce à qui j'ai pu finir ma thèse dans de bonnes conditions. J'ai pu apprendre énormément à tes côtés, sur un sujet extrêmement éloigné de ma formation initiale ... le beau monde des mathématiques et des statistiques. Tu m'as acculturé à une toute autre manière de penser et de voir les neurosciences computationnelles. Tu as su faire preuve d'une pédagogie redoutable et tu m'as offert énormément de ton temps afin que nous puissions mener à bien nos travaux collaboratifs démarrés au cours de ma thèse. J'ai énormément apprécié avoir travaillé à tes côtés, à la fois scientifiquement et humainement.

Je remercie tout mon laboratoire, les différentes équipes du 5^{ème} étage : toute l'équipe de Philippe Faure. En particulier Jérémy, Steve, Romain, Alexandre et bien entendu tous les autres, vous êtes bien trop nombreux pour que je vous cite toutes et tous. J'ai énormément appris à vos côtés et les franches rigolades chaque midi en votre compagnie n'ont fait qu'égayer mes jours passés au labo. Merci les « Faure's » ! Merci également à toute l'équipe de Bruno Cauli et Bertrand Lambolez, Ludo, Régine et tout le monde vous avez été extrêmement agréables avec moi et je suis fier d'avoir fait votre connaissance. Un merci tout spécial à Tom' Watson, pour son humour bien écossais et les discussions enrichissantes que j'ai pu avoir avec lui.

Merci à Sylvie Faivre-Weber, qui mérite bien plus que quelques lignes de remerciement perdues dans un manuscrit de thèse ... Merci d'être là, sans toi la recherche ne tournerait pas et je dois dire que je suis relativement content et soulager de partir avant toi. Il y aura clairement un « après Sylvie » que je ne saurais imaginer ni ne souhaite connaître.

Merci à Bernadette Hanneke qui a toujours été extrêmement agréable, serviable et réactive lorsque l'on avait désespérément besoin de son aide.

Bon, une thèse est faite de hauts et bas même si « je ne pense pas qu'il y ait de bonnes ou de mauvaises situations ». J'ai eu l'incroyable chance de pouvoir compter sur quelques collègues devenus des amis proches dont je ne pourrais me passer. Sophie, Juliette, Guillaume, Antoine et Samir ... que dire ? Merci ? Bien trop peu. Je m'efforcerai de vous rendre le plus possible ce que vous m'avez apporté au quotidien. Merci d'exister. Merci d'être là. Cette thèse ne peut se défaire de l'empreinte que vous y avez laissée. Merci à tous mes

amis du master BIP : Emma, Virginie, Fanny, David, Céline ... avec tout ce qu'on a partagé ensemble depuis le début de nos études ... Je pense à vous les copains !

Enfin, bien entendu que je ne serais rien sans ma famille, mes parents et mes frères. Que dire qui ne serait pas cliché ? Vous m'avez tant donné, tant encouragé, tant soutenu ... Impossible que je puisse être celui que je suis aujourd'hui sans votre présence. Merci à mes frangins et frangines d'adoption, Abdou, Quentin, Guillaume (encore lui ??!), Bonnie et Funny. Auprès de vous la force était avec moi.

Je terminerai ces remerciements par dédier tout mon travail et tout ce que j'ai de plus cher à mon épouse Canny, qui m'offre au quotidien un refuge, un cocon contre ce monde bien souvent hostile. Elle me rend chaque jour meilleur qu'hier, car elle sait que je suis aujourd'hui moins bon que je ne le serai demain.

Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité. Un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté.

W.Churchill

Résumé

La perception consciente du monde extérieur repose sur la coordination spatiotemporelle de l'activité des neurones corticaux. L'une des caractéristiques principales des aires corticales primaires chez les mammifères est leur organisation laminaire en six couches et tangentielle en colonnes fonctionnelles au sein desquelles les neurones partagent les mêmes champs récepteurs.

A partir de données anatomiques, un modèle dit canonique de traitement des informations sensorielles au travers des différentes couches des colonnes corticales a été proposé. Le modèle suppose que l'information sensorielle est traitée de façon sérielle. D'abord au niveau de la couche IV, cible principale des afférences thalamiques. Ensuite au niveau des couches II/III superficielles qui sont fortement innervées par les neurones excitateurs de la couche IV. Et enfin par les neurones des couches profondes, V et VI, qui sont innervés par les cellules pyramidales glutamatergiques des couches superficielles. Les neurones pyramidaux de la couche V constituant la principale sortie du néocortex.

Toutefois, il a récemment été montré que les neurones des couches profondes reçoivent également des informations sensorielles directement par des afférences thalamiques, ce qui pose la question du ou des rôles de la connectivité interlaminaire dans le traitement sensoriel opéré au sein des colonnes corticales.

Afin d'aborder cette problématique, j'ai tiré profit de la technique d'électroporation *in utero* qui permet d'exprimer spécifiquement des protéines photo-activables dans les cellules pyramidales des couches II/III du cortex somesthésique primaire de la souris recevant des informations sensorielles en provenance des vibrisses ; un modèle d'étude très populaire en neurophysiologie de la perception.

Ainsi, j'ai pu évaluer l'impact de manipulations spécifiques et temporellement précises de l'activité des neurones excitateurs des couches superficielles dans le déterminisme des réponses sensorielles des neurones de la couche V évoquées par la stimulation de vibrisses.

En procédant à des enregistrements unitaires multi-sites au sein de différentes couches corticales à la fois chez des animaux anesthésiés et éveillés, j'ai montré que le recrutement des neurones pyramidaux des couches II/III permet d'amplifier les réponses sensorielles des neurones de la couche V. Par ailleurs, l'analyse de ce phénomène d'amplification en fonction de l'intensité des stimulations sensorielles indique que la connectivité interlaminaire joue un rôle majeur dans la modulation du gain des neurones de la couche de sortie du cortex.

Sommaire

A. LE NEOCORTEX : L'ECORCE DE LA PERCEPTION SENSORIELLE	11
1. LE CONCEPT DE CHAMP REPTEUR.....	17
2. ORGANISATION EN COLONNES DES AIRES SENSORIELLES PRIMAIRES	19
3. ORGANISATION LAMINAIRE DES AIRES SENSORIELLES PRIMAIRES	20
B. LA CONNECTIVITE CORTICALE DU RONGEUR	26
1. LE SYSTEME DES VIBRISSES CHEZ LE RONGEUR	26
2. DIVERSITE DES NEURONES DU CORTEX A TONNEAUX	27
3. CONNECTIVITE FONCTIONNELLE EXCITATRICE DU CORTEX A TONNEAUX	33
4. INTEGRATION SENSORIELLE DANS LE SYSTEME DES VIBRISSES	38
C. DISSECTION OPTOGENETIQUE DU ROLE DE LA CONNECTIVITE CORTICALE DANS LE TRAITEMENT SENSORIEL	56
1. LES OPSINES : PROTEINES ACTIVABLES PAR LA LUMIERE	56
2. LA CHANNELRHODOPSINE-2 (ChR2).....	57
3. LES OPSINES INHIBITRICES : HALORHODOPSINE ET ARCHEORHODOPSINE	59
4. DIFFERENTES STRATEGIES D'EXPRESSION DES OPSINES	60
4.1. Les vecteurs viraux.....	60
4.2. L'injection de plasmides par électroporation in utero	64
5. CONSIDERATIONS TECHNIQUES EN LIEN AVEC L'OUTIL OPTOGENETIQUE.....	66
6. QUELQUES EXEMPLES D'UTILISATION D'APPROCHES OPTOGENETIQUES POUR DISSEQUER LE ROLE DE LA CONNECTIVITE CORTICALE DANS LE TRAITEMENT SENSORIEL	67
D. RESULTATS	78
E. DISCUSSION GENERALE	117
1. MECANISMES SOUS-JACENTS AUX EFFETS DE LA PHOTO-SUPPRESSION DES NEURONES PYRAMIDAUX DES COUCHES 2/3 SUR LES REponses SENSORIELLES DES NEURONES DES COUCHES PROFONDES.....	118
2. IMPACT DES NEURONES DES COUCHES 2/3 SUR LES CHAMPS REPTEURS DES NEURONES DES COUCHES PROFONDES	121
3. IMPACT DE LA PHOTO-SUPPRESSION DES NEURONES PYRAMIDAUX DES COUCHES 2/3 SUR LA PERCEPTION SENSORIELLE	122
4. POTENTIELLE DIVERSITE DE CONNECTIVITE DE LA VOIE CANONIQUE L2/3 VERS L5	124
5. ROLE ASSOCIATIF DES NEURONES PYRAMIDAUX DES COUCHES 2/3.....	129
5.1. Les couches 2/3 sont la cible de connectivités cortico-corticales horizontales de courtes et de longues distances.....	130
5.2. Les réseaux corticaux sont plastiques : altérations de la connectivité des couches 2/3.....	132
6. PERSPECTIVES GENERALES	133

INTRODUCTION

Esse est percipi aut percipere

« Être c'est être perçu, ou percevoir ». Derrière cette citation (G. Berkeley) réside l'idée que la réalité propre de l'être pensant se construit (en partie) au travers de sa représentation du monde alentour ainsi que de la place qu'il y occupe. Cette faculté, présente chez tous les animaux y compris chez l'Homme, est primordiale pour la perpétuation de l'espèce. Les capacités de survie d'un animal dépendent de manière critique de sa faculté à percevoir les informations environnantes, les interpréter, et réagir de manière appropriée au contexte dans lequel il se trouve. Ceci est rendu possible grâce aux opérations effectuées par le cerveau qui traite de manière centrale les informations perçues par les organes sensoriels de l'organisme. Ainsi Aristote définissait chez l'Homme cinq sens majeurs qu'il classifiait en fonction de la nature du signal biophysique transmis : les photons pour la vision, les vibrations acoustiques pour l'ouïe, les composés organiques volatiles et dissouts pour l'odorat et le goût, et enfin les déformations mécaniques pour le toucher.

La compréhension des processus neuronaux qui sous-tendent les mécanismes allant de la perception des informations sensorielles à leur conceptualisation (perception consciente) est une question fondamentale en neurosciences. Pour cela il est nécessaire de décrire l'organisation structurelle des connexions entre les neurones, et de comprendre le fonctionnement contextuel des réseaux neuronaux dans le cadre d'un processus cognitif d'intérêt.

A. Le néocortex : l'écorce de la perception sensorielle

S'il est classiquement admis que la perception consciente de l'environnement repose sur la coordination dans le temps et dans l'espace de l'activité des neurones corticaux, trois questions fondamentales se posent : i) quels sont les traitements opérés par le cortex ; ii) quels sont les mécanismes à la base de ces opérations ; et enfin iii) quels sont les substrats structurels et biophysiques par lesquels ces opérations sont implémentées.

Les premières révolutions en neurophysiologie sont issues de travaux réalisés dans le système visuel, somesthésique ou encore moteur de différents modèles d'étude (chat, crapaud, primate, rongeur) et remontent au début du 20^e siècle. Les techniques d'enregistrements électrophysiologiques des neurones (unitaires, ou populationnels) ont permis d'aborder l'une des questions fondamentales dans l'étude de l'intégration sensorielle, à savoir comment un neurone intègre et transmet une information en provenance du monde extérieur. Le premier élément de réponse provient des travaux pionniers du prix Nobel (1932) E.D. Adrian, qui a pour la première fois montré un corrélât neuronal à la contraction musculaire : les motoneurones produisent, de manière proportionnelle à l'intensité de la contraction musculaire du crapaud, des événements électriques de type « tout-ou-rien » que l'on appelle « potentiels d'action » (PA) décrits initialement par le physiologiste allemand Émile du Bois-Reymond (pour revue Rieke, 1999). Adrian a fait une seconde observation primordiale : la quantité de potentiels d'action des récepteurs à l'étirement (du muscle) dépend de la force appliquée au muscle. Il existe donc une relation entre l'intensité d'une stimulation (sensorielle ou motrice) et l'activité des neurones reflétée par le nombre de PA qu'ils émettent par unité de temps. Cela a conduit à l'idée générale qu'un neurone transforme une variable d'entrée (par exemple la force d'un stimulus) en fréquence de décharge.

Lors de l'enregistrement intracellulaire d'un neurone, il est possible de lui injecter un courant continu de différentes intensités. La relation entre la fréquence de décharge (F) du neurone et l'intensité du courant (I) injecté appelée « relation entrée-sortie » (relation F-I dans le cas d'une injection de courants ou encore « fonction de transfert » dans un cas plus général). Cette relation permet d'évaluer la manière dont ce neurone peut intrinsèquement transformer l'intensité d'un stimulus en un train de potentiels d'action d'une certaine fréquence. La courbe représentative de la relation F-I est généralement linéaire (ou sigmoïdale dans le cas d'une saturation de la fréquence de décharge). Elle est caractérisée par : i) un seuil de stimulation Θ

à partir duquel le neurone commence à décharger ii) un EC50 correspondant à intensité du stimulus permettant d'obtenir 50% de la réponse maximale iii) une pente de la partie linéaire (autrement appelé « gain », γ) reflétant le lien de proportionnalité entre l'intensité du courant et la fréquence de décharge et éventuellement par iv) un plateau (R_{max} , si la courbe est une sigmoïde) correspondant à la réponse maximale saturante du neurone (**Figure 1A**). Ces relations « entrée-sortie » peuvent également être mesurées par des protocoles de stimulations sensorielles. Les relations « entrée-sortie » d'un neurone ne sont pas fixes mais peuvent être modulées par plusieurs paramètres tels que l'état d'activation des réseaux neuronaux locaux ou l'attention de l'animal (Andersen and Mountcastle, 1983; Mcadams and Maunsell, 1999; Polack et al., 2013; Mcginley et al., 2015; Vinck et al., 2015). Cette modulation peut résulter en une modification de la valeur seuil du stimulus nécessaire pour faire décharger le neurone ou une modification du gain (Chance et al., 2002; Destexhe et al., 2003; Haider and McCormick, 2009). On parle d'effets multiplicatifs (ou divisifs) lorsque le gain est augmenté (ou diminué), et d'effets additifs (ou soustractifs) lorsque le seuil est modifié (**Figure 1B**).

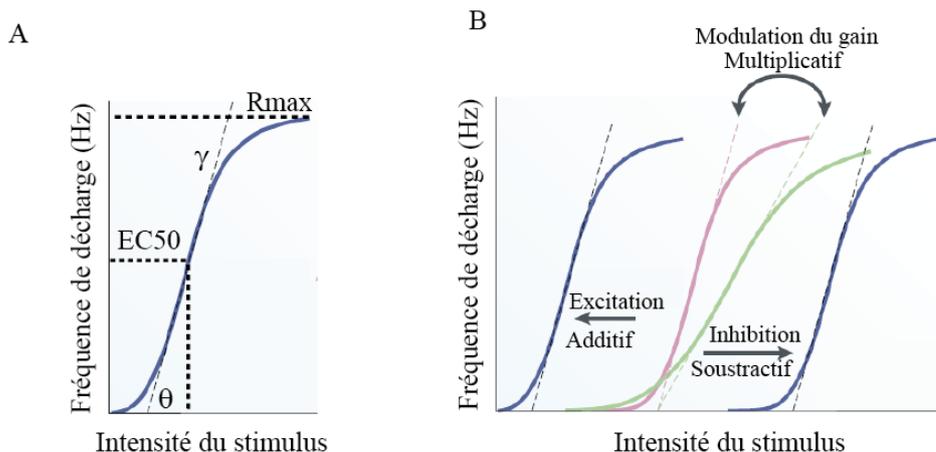


Figure 1 : Courbes représentatives des fonctions de transfert ou «courbe de gain» théoriques d'un neurone. Adapté de [Destexhe et al., 2003]

A) Les différents paramètres qui caractérisent une courbe de gain. R_{max} , réponse maximale correspondant au plateau de saturation des réponses; EC50, intensité du stimulus permettant d'obtenir 50% de la réponse maximale ; γ , pente de la partie linéaire de la courbe; θ , seuil de la partie linéaire de la courbe.

B) Les différents types de modulation des fonctions de transfert. La courbe contrôle (violette) peut être déplacée vers la droite ou la gauche ce qui correspond à une modulation additive ou soustractive de la fonction de transfert du neurone (courbes bleues). Une variation de la pente (courbe verte) correspond, quant à elle, à une modulation multiplicative de la fonction de transfert (Destexhe et al., 2003).

Plusieurs études conduites *in vitro* et *in vivo* ont cherché à comprendre les mécanismes cellulaires à la base des modulations des fonctions de transfert des neurones. Il a été proposé que des variations du niveau de potentiel de membrane moyen, de résistance membranaire ainsi que des changements de l'amplitude des fluctuations du potentiel de membrane entraînent des modifications du gain des neurones (Hô and Destexhe, 2000; Chance et al., 2002; Cardin et al., 2008; Altwegg-Boussac et al., 2014).

Le problème lié au codage fréquentiel est qu'il repose sur une fréquence de décharge de potentiels d'action moyennée sur une plus ou moins longue période de temps. Or des expériences comportementales montrent que les organismes ont des temps de réaction très courts : les hommes peuvent par exemple reconnaître une scène visuelle en quelques centaines de millisecondes, environ 150 ms (Thorpe et al., 1996). Une autre forme de codage par la structure temporelle d'un train de PA (« codage temporel ») a été proposée pour outrepasser les divers inconvénients liés au codage fréquentiel (Bialek et al., 1991; Bialek and Rieke, 1992; Mainen and Sejnowski, 1995; Reinagel and Reid, 2000; Ince et al., 2010). Le codage temporel peut refléter différentes caractéristiques du patron de décharge d'un neurone : l'intervalle de temps entre les PA ou encore le temps de latence séparant le début de la stimulation et le premier PA évoqué. Cependant, cette forme de codage pose également un problème majeur : les neurones n'ont pas connaissance à priori du temps d'arrivée d'un stimulus externe. Donc l'encodage d'un stimulus qui repose sur le temps de latence par exemple n'est utilisable que par l'observateur externe qui a une information préalable des temps de stimulation. Il est également envisageable que d'autres formes de codage d'ordre supérieur soient utilisées pour encoder différents paramètres d'un stimulus, reposant sur l'activité d'une assemblée de neurones plutôt que par l'activité des neurones individuels. Il a par exemple été montré dans le cortex moteur du macaque que la direction du mouvement du bras est codée non pas par la fréquence de décharge d'un neurone unique, mais par celle d'une population de neurones (Georgopoulos et al., 1982, 1986, 1989). En effet, les neurones du cortex moteurs répondent à différentes directions du mouvement avec une sélectivité relativement large (**Figure 2A**). Ainsi, l'analyse de l'activité de neurones individuels peut entraîner une ambiguïté quant à la direction du mouvement. Georgopoulos et collaborateurs proposent que l'activité de chacun des neurones puisse être vectoriellement additionnée pour créer ce qu'ils appellent un « vecteur populationnel ». Ils ont ainsi montré que l'analyse de ces vecteurs populationnels permet une meilleure prédiction de la direction du mouvement (**Figure 2B**).

Un autre aspect du codage populationnel à considérer est le codage par la corrélation de l'activité des neurones. Les activités corrélées dans le temps peuvent être définies de la manière suivante : lorsque deux neurones sont corrélés, ils ne déchargent pas de potentiels d'action de manière indépendante ; si bien que lorsqu'un neurone décharge, la probabilité de décharge du second est plus forte. Cette relation entraîne une synchronie de l'activité entre plusieurs neurones. Plusieurs études ont montré que l'état de synchronie des réseaux locaux est modulé par les propriétés des stimuli. Par ailleurs, ce type de codage est modulé par le niveau d'attention. Ainsi, chez le macaque la synchronie entre des paires de neurones du cortex somesthésique secondaire augmente lorsque l'animal est attentif et diminue drastiquement lorsque son attention est détournée (pour revue : (Salinas and Sejnowski, 2001)).

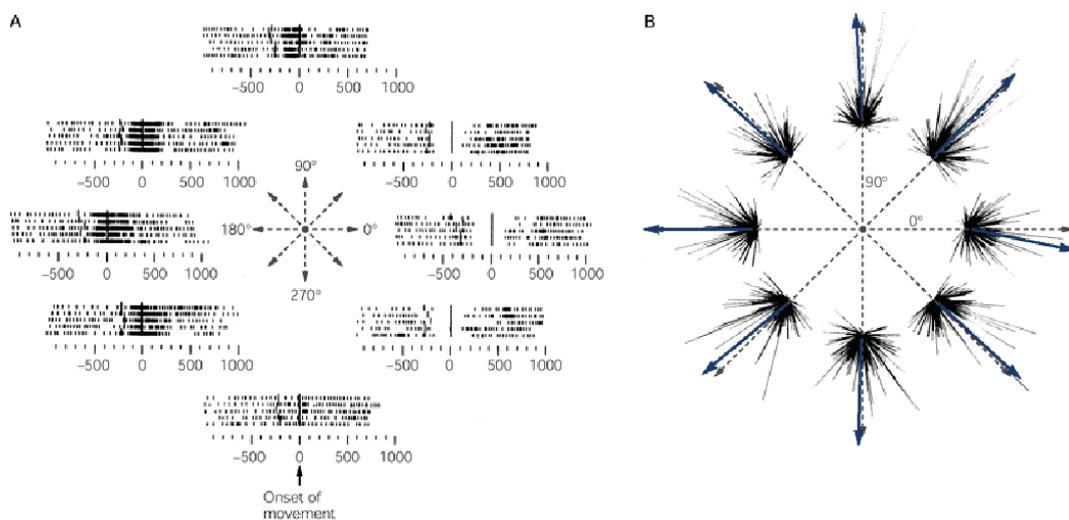


Figure 2 : La direction des mouvements est encodée dans le cortex moteur par le patron d'activité d'une population de neurones. Adapté de [Georgopoulos et al., 1982]

A) Représentation en rasters de l'activité des neurones du cortex moteur en fonction de la direction du mouvement. Chaque barre verticale représente un potentiel d'action, chaque ligne correspond à un essai. Le neurone illustré est activé par plusieurs directions du mouvement du bras, avec une préférence pour des mouvements orientés entre 90° et 225°.

B) Activité populationnelle de plusieurs neurones du cortex moteur en fonction de la direction du mouvement du bras. L'ensemble de ces réponses conduit à un vecteur populationnel qui correspond fidèlement à la direction du mouvement. Les flèches continues représentent les vecteurs populationnels ; les flèches en pointillés représentent la direction du mouvement.

Depuis les travaux pionniers d'Hubel et Wiesel, il est établi que la dynamique spatiotemporelle des entrées synaptiques en provenance du thalamus, la porte d'entrée principale des informations sensorielles vers le cortex, est à la base de la capacité d'encodage par les neurones corticaux de certains attributs d'un stimulus sensoriel comme l'orientation d'une barre dans l'espace (Hubel and Wiesel, 1959). Cependant, loin de passivement recevoir les informations en provenance du thalamus, la manière dont les neurones corticaux encodent

les informations sensorielles est dépendante de leurs propriétés intrinsèques et synaptiques. Ainsi, la description des cartes de connectivité fonctionnelle est une étape clé pour comprendre les traitements opérés au sein du cortex.

D'une épaisseur de 3-4 mm, le néocortex humain compte aux alentours de 28×10^9 neurones (et approximativement le même nombre de cellules gliales). Ces neurones sont interconnectés par le biais d'un vaste nombre de synapses (de l'ordre de 10^{12}). Les premières descriptions anatomiques faites au début du XX^e siècle révèlent une organisation laminaire du cortex. C'est en adaptant la technique de coloration dite « à l'imprégnation à l'argent » élaborée par Camillo Golgi à différents tissus du système nerveux central dont le néocortex, que Santiago Ramon y Cajal put mettre en évidence la présence de plusieurs couches corticales ainsi que la morphologie de certaines cellules (**Figure 3**). Ces couches diffèrent par leur épaisseur ainsi que par la taille, la densité et la morphologie des neurones qui s'y trouvent. Au niveau des aires sensorielles primaires, il est classiquement admis que le cortex est divisé en six couches (Oberlaender et al. 2012 ; Fig. 1). La couche 1 étant la plus superficielle et la couche 6, la plus profonde.

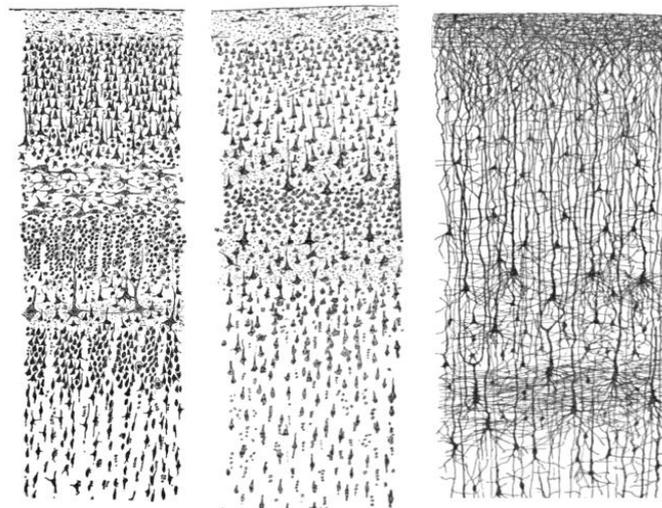


Figure 3 : Dessins de Santiago Ramon y Cajal.

Les dessins de gauche et du milieu décrivent les structures laminaires du cortex visuel (gauche) et du cortex moteur (droite) obtenues avec un marquage de type Nissl. Celui de droite est obtenu en utilisant la technique de révélation de Golgi qui permet de dévoiler l'arborisation dendritique des neurones corticaux.

À partir de ses travaux, Cajal a fait l'hypothèse que le néocortex était échafaudé sur la base de circuits neuronaux stéréotypés, comme ceux qu'il avait découverts dans la rétine, le cervelet, l'hippocampe ou encore la moelle épinière. Malgré la rigueur et l'exhaustivité de ses

travaux d'anatomie, Cajal n'a cependant jamais pu valider cette hypothèse. L'intuition de Cajal a été démontrée quelques décennies après sa mort, non pas par des anatomistes mais de manière surprenante par des physiologistes. Ce sont eux qui ont apporté un ensemble de connaissances considérable sur l'organisation du cortex en procédant à des expériences de neurophysiologie *in vivo*. Cette avancée majeure sur la compréhension globale de l'organisation anatomo-fonctionnelle du cortex est imputée à trois grands neurophysiologistes : V.Mountcastle (1918-2015), et les prix Nobel D.Hubel (1926-2013) & T.Wiesel (1924-). C'est en étudiant les champs récepteurs et les réponses sensorielles des neurones corticaux dans les systèmes somesthésique (V.Mountcastle, chat et macaque) et visuel (D.Hubel & T.Wiesel, chat) qu'ils ont pu proposer l'existence d'un modèle canonique de la connectivité corticale.

Ce modèle stipule que les informations sensorielles sont traitées de manière sérielle au niveau des aires corticales primaires. D'abord relayées depuis le thalamus vers la couche 4, ces informations sont intégrées et transmises vers les couches superficielles 2/3 puis vers les couches 5 et 6 qui constituent les principales voies de sortie du cortex. Toutefois, l'implication de cette connectivité intracorticale interlaminaire dans l'intégration des informations sensorielles n'a pas été totalement démontrée. Au contraire, plusieurs études remettent en cause ce modèle. En particulier, une étude récente montre que les neurones de la couche 5 reçoivent des afférences thalamiques directes et suggère une déconnexion fonctionnelle entre les couches 2/3 et la couche 5 durant le traitement sensoriel (Constantinople and Bruno, 2013). Ainsi, c'est dans ce contexte que je me suis intéressé au cours de ma thèse à l'impact fonctionnel de cette connexion L2/3-L5 sur les processus d'intégration sensorielle.

Je me propose dans un premier temps de faire un rappel historique des travaux pionniers d'Hubel & Wiesel, en décrivant comment à partir de l'étude des champs récepteurs et des projections axonales des neurones du cortex visuels du chat ils ont pu établir le modèle canonique de la connectivité corticale. Ensuite, j'aborderai la description d'un autre modèle extrêmement populaire lorsqu'il s'agit d'étudier la neurophysiologie de la perception : le système somatosensoriel traitant les informations en provenance de l'activité des vibrisses chez la souris. En effet, c'est le système modèle que j'ai utilisé au cours de ma thèse pour étudier le rôle de la connexion corticale interlaminaire L2/3-L5 dans le traitement sensoriel opéré par le cortex. J'ai utilisé ce modèle car il offre, entre autre, l'opportunité unique de procéder à des manipulations génétiques et ainsi d'exprimer des gènes d'intérêts de manière

spécifique dans des sous-populations de neurones. J'ai tiré profit de cet avantage pour utiliser une technique récemment développée de manipulation de l'activité neuronale, qui repose sur l'expression de protéines activables par la lumière : l'optogénétique. Je terminerai donc cette introduction par la description de l'outil optogénétique et de son utilisation dans le cadre des études de la connectivité corticales en lien avec le traitement sensoriel.

1. Le concept de champ récepteur

C'est en 1938 que le terme de champ récepteur a été défini comme étant la portion de l'espace qui lorsqu'elle est stimulée évoque une réponse sensorielle dans le nerf optique du crapaud (pour revue voir Spillmann, 2014). L'organisation ainsi que les processus sous-jacents aux champs récepteurs de la rétine ont été par la suite décrits chez le chat. En stimulant différents champs récepteurs de la rétine avec des cercles de lumière de petite taille, il a été montré que les champs récepteurs des cellules ganglionnaires étaient organisés de manière concentrique. Certains de ces champs récepteurs étaient caractérisés par un centre « on » (activable par la lumière) et une périphérie « off » (inhibée par la lumière), et inversement (Kuffler, 1953). Dans le système visuel, ces informations sensorielles sont transmises au cortex visuel primaire par le Corps Géniculé Latéral (CGL) du thalamus dont les champs récepteurs concentriques sont similaires à ceux de la rétine (Hubel and Wiesel, 1961). Au niveau du cortex visuel primaire, il est apparu contre toute attente que l'organisation des champs récepteurs était différente de celle retrouvée au niveau de la rétine (Hubel and Wiesel, 1959). La description de la conformation des champs récepteurs a été effectuée selon le même protocole que celui utilisé dans la rétine, et révèle que le stimulus produisant une réponse optimale avait une forme de barre allongée (**Figure 4A**). Par exemple, certains neurones ont une région centrale allongée excitatrice, restreinte par deux régions inhibitrices symétriques. La réponse du neurone est maximale si la barre lumineuse est orientée de telle manière à ce que la région excitatrice soit pleinement stimulée. Ainsi, la forme particulière du champ récepteur confère aux neurones corticaux la propriété d'être sélectif à l'orientation d'un stimulus lumineux en forme de barre (**Figure 4A**). Le mécanisme sous-jacent à la sélectivité à l'orientation a été proposé comme étant la résultante de l'alignement des champs récepteurs concentriques des neurones du CGL, qui convergent vers un même neurone du cortex visuel primaire (Hubel and Wiesel, 1962).

La capacité d'un neurone cortical à répondre à une stimulation lumineuse en forme de barre peut également dépendre de la direction dans laquelle cette barre est mise en

mouvement. Dans l'exemple de la **Figure 4B**, le neurone possède une région centrale inhibitrice restreinte par deux régions excitatrices asymétriques (celle de gauche étant plus étendue que celle de droite). Ainsi, la stimulation qui active d'abord la région excitatrice de gauche évoque moins de PA que celle qui débute par la région excitatrice de droite (**Figure 4B : protocole d**). Ce phénomène est potentiellement dû à un effet synergique entre la région inhibitrice centrale et la région excitatrice la plus forte : on peut imaginer qu'un rebond d'activité entraîné par l'arrêt de la stimulation de la région inhibitrice coïncide avec la stimulation de la région excitatrice la plus forte, entraînant une sommation d'activité plus efficace.

Ces cellules corticales que l'on nomme « simple cells » ont également été retrouvées dans d'autres modèles d'études comme le primate (Hubel and Wiesel, 1968) ou la souris (Dragner, 1975; Niell and Stryker, 2008).

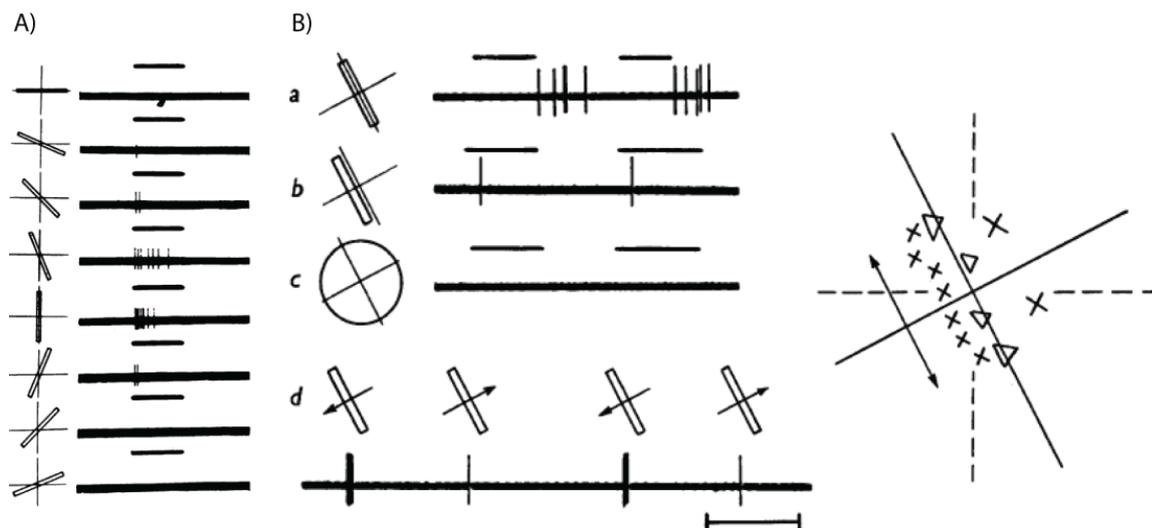


Figure 4 : Sélectivité à l'orientation et à la direction des neurones « simple cells » du cortex visuel du chat [adapté de Hubel & Wiesel, 1959].

A) neurone cortical sélectif à des barres orientées. Le panel de gauche indique l'orientation des barres. Le panel de droite indique la réponse du neurone enregistré.

B) Sélectivité à la direction d'un neurone dont les régions excitatrices (indiquées par des croix sur le panel de droite) du champ récepteur sont asymétriques. La direction des barres est indiquée sur le panel de gauche, et les réponses correspondantes sur le panel du milieu. En a), la position de la barre est située au niveau de la région inhibitrice du champ récepteur, l'arrêt de la stimulation évoque une réponse en rebond ; en b) la position de la barre est située au niveau de la zone excitatrice ; en c) stimulation concentrique n'évoquant aucune réponse. Enfin en d) la barre orientée de manière préférentielle au champ récepteur du neurone évoque l'activité la plus ample lorsqu'elle est déplacée de manière orthogonale de la région excitatrice la plus faible vers la région excitatrice la plus forte (de droite à gauche).

Toutefois, il existe une diversité des réponses sensorielles et des propriétés des champs récepteurs des neurones du cortex visuel. A titre d'exemple, les cellules corticales qualifiées de « complex cells » présentent la particularité de répondre à des objets de différentes formes,

stationnaires ou en mouvement, d'une manière qui ne puisse être prédite par la cartographie de leur champ récepteur (Hubel and Wiesel, 1962).

2. Organisation en colonnes des aires sensorielles primaires

L'étude des réponses sensorielles des neurones du cortex visuel de type « simple cells » a révélé une disparité dans les propriétés des champs récepteurs. Par exemple, certains neurones sont activés par des barres orientées verticalement, alors que d'autres le sont par des barres orientées horizontalement. Hubel et Wiesel se sont posé la question de savoir si cette diversité était associée à une organisation spatiale spécifique des neurones à travers le cortex, ou bien si ceux-ci sont distribués aléatoirement. Pour répondre à cette question, ils ont cartographié les propriétés des champs récepteurs des neurones en fonction de la position spatiale de l'électrode d'enregistrement (**Figure 5**).

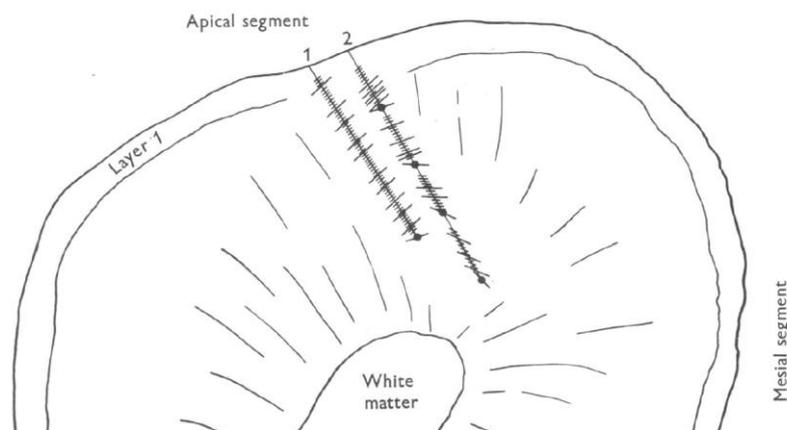


Figure 5 : La structure spatiale des réponses des neurones du cortex visuel révèle une organisation tangentielle du cortex visuel primaire en colonnes de sélectivité à l'orientation (tiré de Hubel & Wiesel, 1962).

Reconstructions de deux descentes parallèles d'électrodes indépendantes (1 et 2). Chaque ligne perpendiculaire à celle représentant le chemin de l'électrode correspond à l'orientation du champ récepteur des neurones enregistrés. Chaque cercle plein correspond à une lésion électrolytique à partir du premier changement d'orientation du champ récepteur. Tant que l'électrode reste orthogonale à la surface du cortex, les neurones enregistrés possèdent des champs récepteurs orientés de manière similaire.

Ils se sont aperçus que temps que la pénétration de l'électrode était perpendiculaire à la surface du cortex, les neurones enregistrés au fur et à mesure de la descente partageaient des propriétés communes de leur champ récepteur dont la principale était son orientation. En revanche, dès l'instant où la pénétration de l'électrode était tangentielle à la surface du cortex, les neurones enregistrés au fur et à mesure de la descente présentaient des sélectivités à

l'orientation différentes de leurs champs récepteurs (Hubel and Wiesel, 1962; Hubel and Wiesel, 1963). Toutefois, cette segmentation tangentielle du cortex n'est pas corrélée à une organisation cellulaire anatomiquement distincte.

Initialement décrite par V. Mountcastle dans le cortex somesthésique du chat et du primate, il a ainsi été proposé que tous les neurones qui partageaient des propriétés communes de leur champ récepteur étaient alignés de manière verticale à la surface du cortex selon une disposition en colonne (Mountcastle et al., 1957; Mountcastle, 1997).

3. Organisation laminaire des aires sensorielles primaires

Ce résultat suggère que l'organisation laminaire du cortex pourrait également jouer un rôle important dans les processus d'intégration sensorielle. Gilbert et Wiesel ont abordé cette question en réalisant des enregistrements intracellulaires de neurones corticaux (et du CGL) chez le chat, dans le but de déterminer les propriétés de leurs réponses sensorielles en relation avec leur position laminaire. Cette technique leur a permis de procéder à des reconstructions anatomiques des projections axonales, de l'arborisation dendritique et du corps cellulaire du neurone enregistré en injectant un marqueur cellulaire par l'électrode d'enregistrement intracellulaire (« Horseradish Peroxydase », ou peroxydase de raifort) (Gilbert and Wiesel, 1979).

Les auteurs sont partis du postulat que les axones se connectent aux neurones dont les corps cellulaires sont situés dans la couche dans laquelle ils projettent. Ainsi en visualisant le trajet d'un axone et plus particulièrement là où il se termine, il devient possible de supposer l'existence de connexions synaptiques entre le neurone présynaptique et le ou les neurone(s) en aval appartenant à une couche corticale particulière (position relative de leur corps cellulaire). En effet, les dendrites baso-latérales représentent environ 80-90% de la longueur totale des dendrites (apicales + baso-latérales) et ont statistiquement beaucoup plus de connexions synaptiques que les dendrites apicales. Donc le postulat très simple de Gilbert & Wiesel permet de faire une estimation approximative des règles de connectivités corticales inter- et intralaminaires sur la base de reconstructions anatomiques.

Ils ont ainsi mis en évidence que la couche granulaire (couche 4), décrite ainsi pour sa forte densité de corps cellulaires, est la principale source d'entrée des informations en provenance des structures sous-corticales et plus particulièrement le thalamus (**Figure 6A**). Les neurones de la couche 4 en forme de cellules étoilées possèdent des champs récepteurs du

type « simple cells ». Ces neurones présentent des axones dont un certain nombre de collatérales innervent la couche 4, et d'autres projettent massivement vers les couches supragranulaires (couches 2 et 3) (**Figure 6B**).

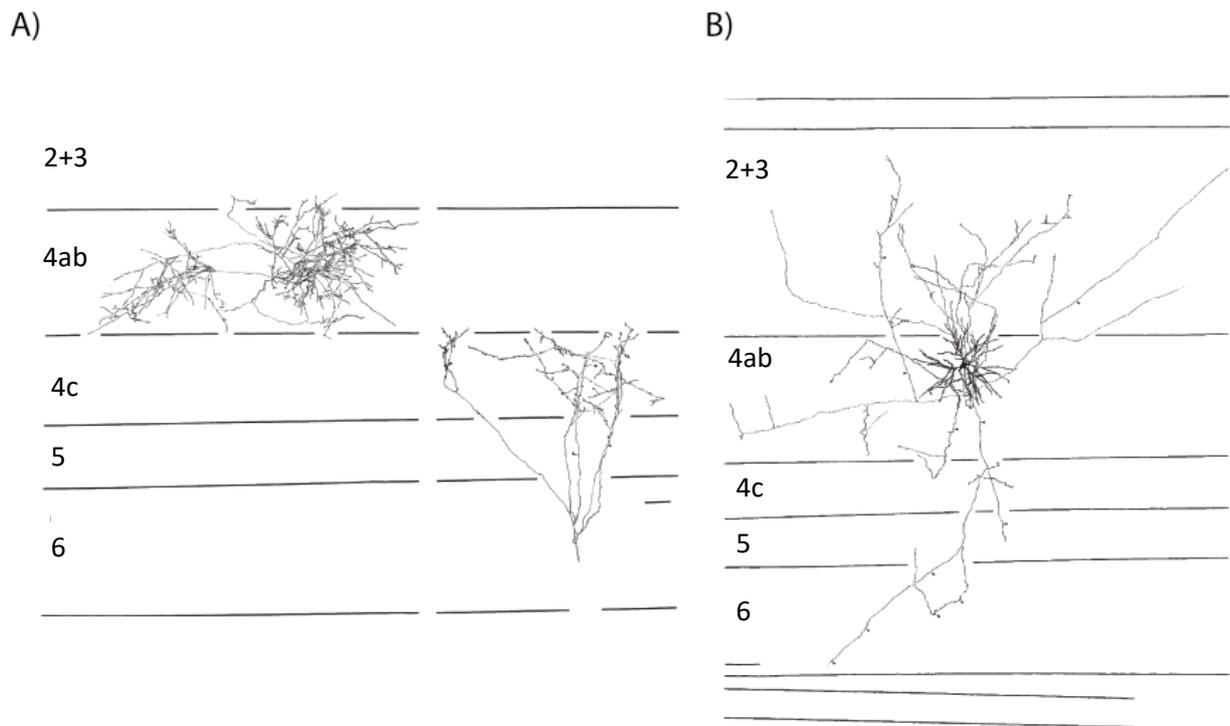


Figure 6 : Reconstructions anatomiques de différents neurones corticaux de la couche 4 et de leurs afférences, adapté de [Gilbert & Wiesel 1979].

A) Deux afférences thalamiques (CGL) projetant dans la couche 4ab et 4c.

B) Cellule étoilée épineuse (spiny stellate) dont le soma se situe dans la couche 4ab, et projette ses axones majoritairement vers les couches superficielles.

Les neurones des couches 2/3 sont majoritairement des cellules pyramidales dont la quasi-totalité d'entre elles sont des neurones de type « complex cells ». Les axones de ces neurones projettent préférentiellement dans les couches infragranulaires (couche 5 mais également couche 6) (**Figure 7**). Ils présentent également d'importantes ramifications internes aux couches 2/3 et certains axones quittent le cortex visuel pour se terminer dans d'autres aires corticales ipsi- ou contralatérales (projections callosales).



Figure 7 : Reconstruction anatomique d'un neurone pyramidal des couches 2/3 de type « complex cells », adapté de [Gilbert & Wiesel 1979].

Les axones des neurones pyramidaux des couches 2/3 projettent dans la couche 5 (et 6), et dans les couches 2/3.

La couche 5 est la principale voie de sortie du cortex ; les neurones qui s'y trouvent projettent vers des structures sous-corticales, mais aussi vers les couches 2/3 et 6 du cortex visuel primaire et d'autres aires corticales (**Figure 8A**). Les neurones pyramidaux de la couche 5 (dont le soma est de plus grande dimension que ceux trouvés dans les couches 2/3) sont principalement des « complex cells ». La couche 6 est particulière dans le sens où elle reçoit des projections thalamiques en provenance du CGL. Les neurones de la couche 6 peuvent être des « simple cells » ou des « complex cells », et leurs axones projettent principalement vers la couche 4 et également vers le thalamus (**Figure 8B**).

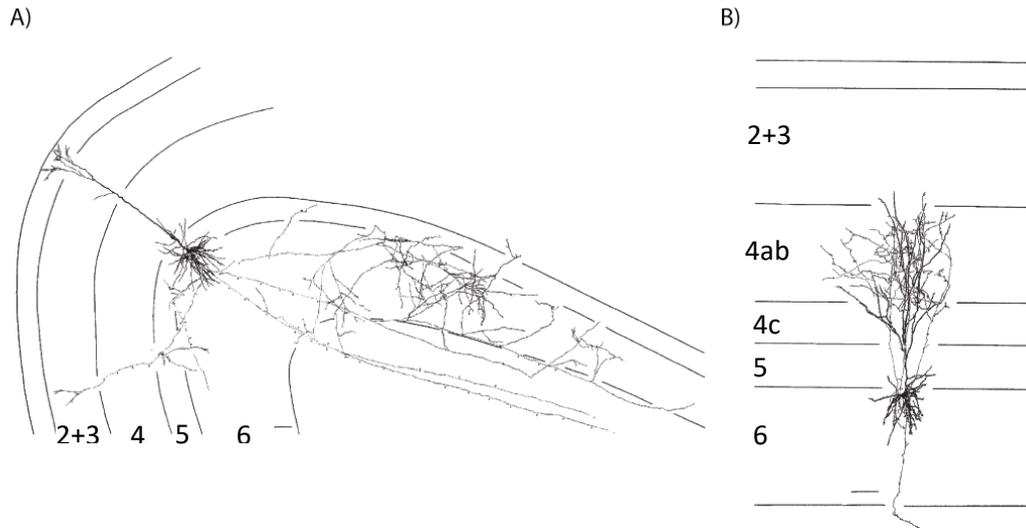


Figure 8 : Reconstructions anatomiques de deux neurones corticaux de la couche 5 et de la couche 6, adapté de [Gilbert & Wiesel 1979].

A) Neurone pyramidal de type « complex cell » dont le soma est situé dans la couche 5. Les axones de cette cellule projettent vers d'autres couches corticales du cortex visuel (2/3 et 6), mais également vers d'autres aires corticales et sous-corticales.

B) Neurone dont le soma est situé dans la couche 6 et qui projette vers la couche 4 et le thalamus (non figuré).

La distribution des différents types de neurones (simple versus complex cells) ainsi que leurs patrons de projections axonales ont conduit les auteurs à établir un modèle de l'intégration sensorielle corticale sériel. Les neurones de la couche 4 sont majoritairement des « simple cells », cellules dont le champ récepteur serait hérité de l'alignement des champs récepteurs des neurones thalamiques qui les contactent. Les neurones pyramidaux des couches 2/3 sont quant à eux des cellules de type « complex cells » et sont principalement contactés par les axones des neurones de la couche 4. Les auteurs proposent que leurs champs récepteurs soient dérivés de la convergence de plusieurs « simple cells ». De la même manière, les projections étendues des neurones de la couche 2/3 vers ceux de la couche 5 expliqueraient la prédominance des neurones de type « complex cells » dans cette couche profonde du cortex. Enfin la couche 6 est constituée de neurones à la fois de type « simple et complex cells ».

Ces résultats tentent d'expliquer l'origine et la distribution des différents types de champs récepteurs au sein des différentes couches, par la description anatomique de la connectivité des afférences thalamo-corticales et cortico-corticales. Ceci a conduit à établir le modèle canonique de la connectivité corticale (**Figure 9**).

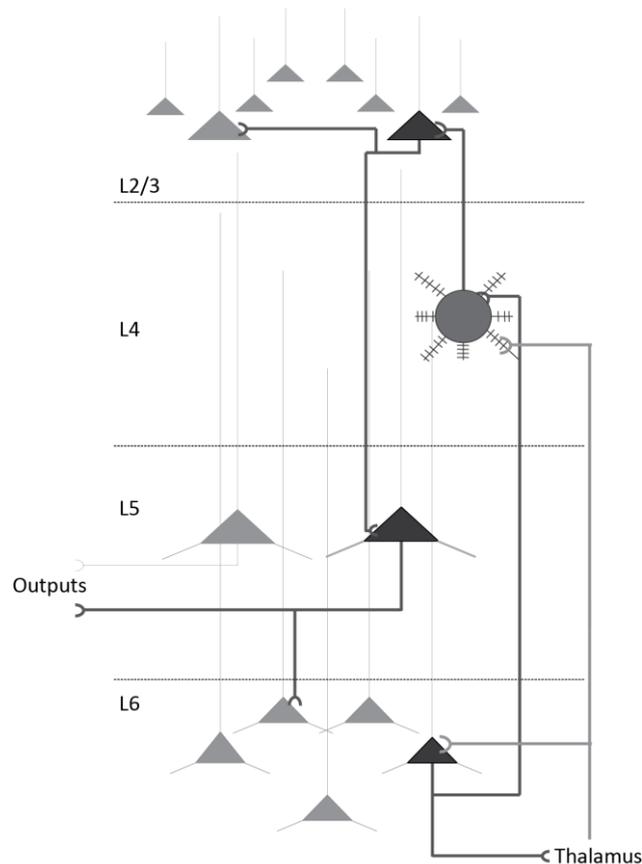


Figure 9 : Modèle canonique de la connectivité corticale.

Les informations sensorielles arrivent dans la couche 4 en provenance du thalamus, sont relayées d'abord aux couches superficielles 2/3 et ensuite à la couche 5 (principale voie de sortie du cortex) et 6. De nombreuses connexions intracorticales ne figurent pas sur ce schéma

Malgré tout, un nombre conséquent d'éléments manquent et un certain nombre de questions restent ouvertes. Certaines connexions alternatives ont été proposées. Par exemple, il a été montré en supprimant par des agents pharmacologiques l'activité neuronale de la couche 4 ou encore du thalamus, que les propriétés des champs récepteurs des couches superficielles (couche 2/3) et profondes (couche 5) n'étaient pas affectées (Malpeli, 1983; Mignard, M; Malpeli, 1991). Par ailleurs, l'existence d'une projection d'axones d'une sous population de neurones vers une autre n'implique pas nécessairement une connexion synaptique fonctionnelle entre ces deux groupes de neurones. En effet, avec le développement des techniques de microscopie électronique, il a été possible d'observer par exemple que les neurones pyramidaux de différentes sélectivités à l'orientation ne forment pas de connexions synaptiques malgré une courte distance ($< 5\mu\text{m}$) entre l'élément dendritique et l'axone (Lee et al., 2016).

Ainsi, le modèle canonique de la connectivité corticale n'est basé uniquement que sur des études anatomiques des projections neuronales d'une couche vers une autre, ce qui est

discutable. Pour appuyer ce modèle, des enregistrements intracellulaires de paires de neurones situés dans la couche 4, les couches 2/3 et la couche 5 ont été réalisés sur des préparations de tranches du cortex visuel de chat.

Ces expériences ont permis de prouver l'existence de synapses excitatrices fonctionnelles entre les neurones de la couche 4 et ceux des couches 2/3, ainsi qu'entre les neurones des couches 2/3 et ceux de la couche 5 (voir **tableau1** en ce qui concerne les probabilités de connexion et les poids synaptiques). Toutefois, bien que les synapses soient fonctionnelles, il reste à déterminer le rôle et l'implication de ces différentes connexions interlaminaires dans le cadre des processus d'intégration sensorielle.

Projection	Fréquence de détection	Nombre de paires connectées testées	Amplitude (mV)	Latence (ms)	Références
L4E → L2/3P	0.1	5	1.1 +/- 0.5	0.9 +/- 0.24	(Bannister and Thomson, 2007)
L2/3P → L5P	0.5	2	3.2	2.8	(Thomson et al., 2002)

Tableau 1 : Propriétés des connexions synaptiques du circuit canonique.

Ces travaux ont été réalisés dans le cortex visuel primaire du chat (voir références). L'amplitude correspond à la dépolarisation maximale évoquée dans l'élément post-synaptique par la stimulation intracellulaire de l'élément pré-synaptique. La latence indique le délai entre le potentiel d'action de l'élément pré-synaptique et la genèse du PPSE au niveau de l'élément post-synaptique : le résultat indiqué est cohérent avec une connexion monosynaptique.

Le système visuel du chat est un modèle historique qui a été utilisé pour aborder le rôle de la connectivité corticale dans la perception sensorielle. Cependant, avec l'avènement des techniques de manipulation génétique, un autre système modèle a émergé dans l'étude de la neurophysiologie de la perception : le système somesthésique des rongeurs et plus particulièrement celui de la souris. En combinant des enregistrements électrophysiologiques et des manipulations optogénétiques, j'ai utilisé ce modèle pour tenter d'aborder cette problématique. La description de ce modèle d'étude ainsi que les techniques optogénétiques utilisées font l'objet des chapitres qui suivent.

B. La connectivité corticale du rongeur

1. Le système des vibrisses chez le rongeur

Alors que les primates utilisent leurs doigts pour explorer leur environnement proche, les rongeurs utilisent leurs vibrisses, une sorte de moustaches situées de part et d'autre du museau. Avec l'olfaction, le système somesthésique est la plus importante modalité sensorielle chez ces animaux nocturnes dont le système visuel est bien moins développé que chez les carnivores. Les rongeurs utilisent leurs vibrisses pour détecter la position d'un objet, et peuvent récolter diverses informations sur les attributs physiques de cet objet (taille, forme, texture) (Carvell and Simons, 1990). Ainsi le raccourcissement des vibrisses au plus près du museau impacte sévèrement leurs capacités de discrimination tactile (Carvell and Simons, 1996). Les vibrisses sont au nombre de 34 de chaque côté du museau, organisées en matrice de 5 rangées (A-E) contenant chacune 5 à 9 vibrisses (arcs 1 à 9) dont la taille et le diamètre varient. L'aire corticale associée au système des vibrisses est de très grande taille, facile d'accès et constitue la seule région sensorielle du néocortex pour laquelle l'organisation topographique de la connectivité entre les éléments des réseaux neuronaux est associée à un corrélat anatomique clairement identifiable : les « barrells » ou « tonneaux », correspondant à des colonnes corticales (Woolsey and Van der Loos, 1970; Van der Loos and Woolsey, 1973). Les tonneaux peuvent être révélés grâce au marquage à la cytochrome oxydase et ils correspondent à des agrégats de corps cellulaires dans la couche 4 du cortex somesthésique primaire (**Figure 10A**) (Land and Simons, 1985).

Chaque vibrisse excite un nerf sensoriel qui projette de manière topographique au niveau du tronc cérébral dans deux noyaux trigéminaux : le Pr5 et le Sp5. Chaque neurone du Pr5 ne reçoit qu'une fibre sensorielle et le marquage de ce noyau par la cytochrome oxydase permet de révéler une structure dite en « barrelettes » dont l'organisation est l'image de la distribution spatiale des vibrisses. Les neurones de ces deux structures projettent au niveau thalamique sur les neurones du complexe ventro-basal qui inclut le noyau ventro-postérieur médial (VPM) et le noyau postérieur (PO). Le premier reçoit majoritairement ses afférences du Pr5 alors que le second les reçoit du Sp5. Les neurones du VPM participent à la voie lemniscale et projettent au niveau des colonnes à tonneaux. Le PO, un élément de la voie dite paralemniscale, projette majoritairement au niveau des régions septales situées entre les colonnes à tonneaux, ainsi que dans les couches corticales 1 et 5a du cortex à tonneaux

(Figure 10B).

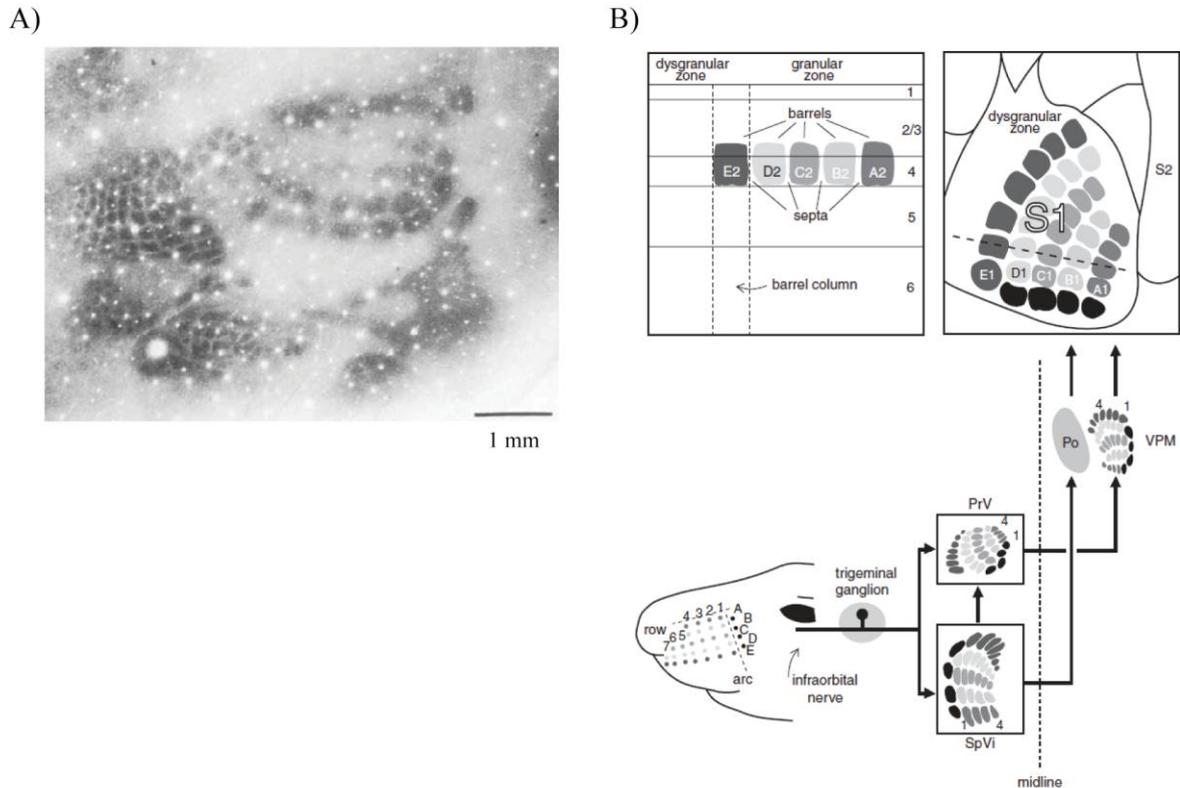


Figure 10 : Schéma du système somatosensoriel du rongeur, adapté de [Deschênes et al. 2005].

A) Section tangentielle à travers la couche 4 du cortex somesthésique primaire (S1) de rat avec un marquage de la cytochrome oxydase, révélant les agrégats cellulaires formant les barils. Chaque baril correspond à une colonne corticale et est délimité par des zones dites septales. Tiré de [Land & Simons, 1985].

B) Schéma représentatif des deux principales voies ascendantes des vibrisses du rongeur. La voie lemniscale débute à partir du noyau principal du noyau trigéminal (PrV), projette vers le noyau ventral postéro-médian du thalamus (VPM) et termine au niveau du cortex à tonneaux. La voie paralemniscale implique le noyau supplémentaire (SpV) et le noyau postérieur du thalamus, et termine préférentiellement dans les zones septales du cortex.

2. Diversité des neurones du cortex à tonneaux

L'identification et la classification des différents types de neurones corticaux ont longtemps été considérées comme un prérequis pour comprendre les fonctions cérébrales. L'obstacle majeur pour élucider cette classification a été la difficulté rencontrée pour définir objectivement des classes neuronales. Les types cellulaires ont été traditionnellement décrits sur la base d'une large variété de caractéristiques incluant notamment la localisation laminaire du corps cellulaire, la morphologie somato-dendritique et axonale, les propriétés électrophysiologiques intrinsèques, la physiologie synaptique ou encore la présence ou l'absence de certains gènes marqueurs. La classification basée sur cette vaste gamme de critères reste difficile et n'a pas permis d'aboutir à un consensus, c'est-à-dire que les

différentes catégories peuvent se recouvrir et ne sont donc pas robustes. Ainsi cette partie n'a pas la prétention de détailler de manière exhaustive l'ensemble de la (des) classification(s) neuronale(s), mais de souligner les principales caractéristiques des neurones corticaux retrouvées au niveau du cortex somesthésique du rongeur.

La grande majorité des cellules glutamatergiques sont des neurones excitateurs pouvant être divisés en trois grandes classes en fonction de leur morphologie : les cellules épineuses étoilées, les cellules pyramides étoilées et les cellules pyramidales à proprement parlé.

Les neurones épineux étoilés sont nommés ainsi à cause de la forme étoilée de leur arborisation dendritique. Leur corps cellulaire est principalement situé au niveau de la couche 4. La majeure partie de ces neurones délimite les tonneaux (un agrégat cellulaire au niveau de la couche 4 restreint à une colonne) et leur arborisation dendritique est préférentiellement orientée vers le centre du tonneau plutôt que vers les zones septales (cellules asymétriques). Les autres cellules épineuses étoilées situées au centre des tonneaux ou bien dans un septum (entre les colonnes à tonneaux) ont une arborisation dendritique répartie de manière plus uniforme (cellules symétriques) (Harris and Woolsey, 1979). Leurs axones sont principalement orientés de manière parallèle aux colonnes corticales, et projettent majoritairement au niveau des couches 1, 2/3 et 4 mais également dans la couche 6 (**Figure 11B**).

Les neurones pyramidaux et les neurones pyramidaux étoilés possèdent une morphologie caractéristique de leur corps cellulaire, en forme de pyramide plus ou moins large selon la couche corticale. Les petites cellules pyramidales sont retrouvées essentiellement dans les couches superficielles 2 et 3, tandis que les grandes pyramides peuvent être retrouvées dans les couches infragranulaires 5 et 6 (**Figure 11A**). Il existe une grande variété morphologique des cellules pyramidales à travers les différentes couches du cortex. La caractéristique partagée par toutes ces cellules est la présence d'une dendrite apicale perpendiculaire à la surface du cortex (exception faite des neurones pyramidaux de la couche 2 les plus superficiels). Les axones des neurones des couches superficielles projettent, comme décrits précédemment, vers la couche 1 et les couches profondes et très largement à l'intérieur même des couches 2/3. Ces neurones envoient également leurs axones, par le corps calleux, vers d'autres aires corticales contra- ou ipsilatérales. Les pyramides de la couche 5 projettent majoritairement vers des structures sous-corticales, mais possèdent également des collatérales qui innervent les couches 2/3 au sein d'une même colonne corticale et à travers

plusieurs colonnes adjacentes. Ces neurones sont beaucoup plus grands que ceux des couches superficielles, et peuvent être séparés en deux sous-catégories sur la base de leur morphologie. Les pyramides dont la dendrite apicale est fine et en forme de touffe au niveau de la couche 1, ne ramifiant pas ou très peu dans les autres couches. Les autres neurones pyramidaux possèdent une dendrite apicale plus épaisse et formant de nombreuses ramifications avant d'atteindre la couche 1.

La couche 4 possède également des neurones qualifiés de « pyramides étoilées » qui se distinguent des neurones épineux étoilés par la présence d'une dendrite apicale ascendante. Ces cellules se distinguent également des neurones pyramidaux des autres couches car cette dendrite apicale n'atteint pas la couche 1 et les corps cellulaires n'ont pas à proprement parler une forme de pyramide. Ces neurones représentent 20-25% des cellules de la couche 4 du cortex somesthésique du rongeur (Staiger et al., 2004).

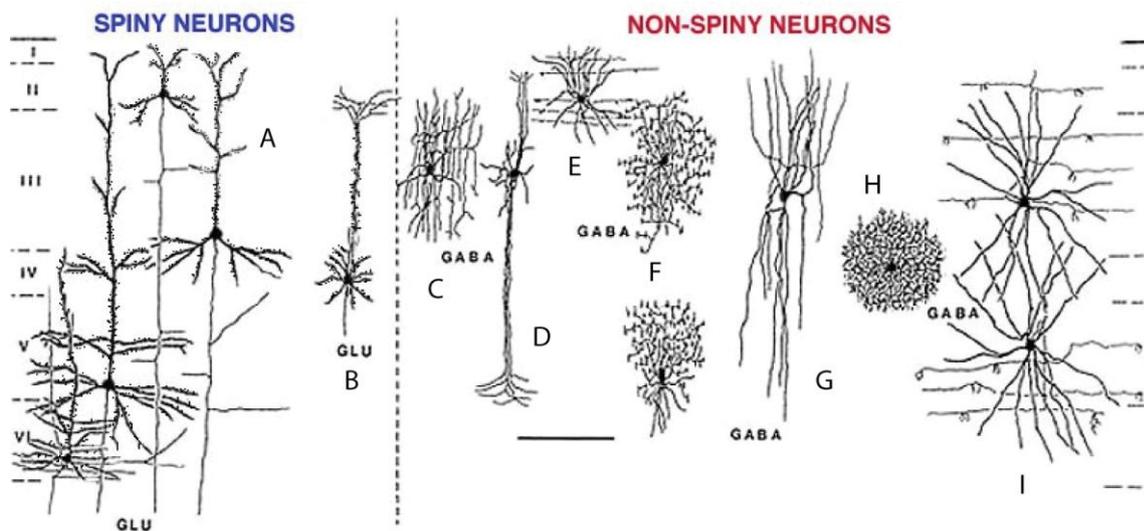


Figure 11 : Principales morphologies des neurones corticaux associées aux types de neurotransmetteurs libérés, adapté de [Peter & Jones, 1894].

À gauche : neurones épineux de type glutamatergique.

À droite : neurones non-épineux de type GABAergiques ; C, cellules à axones locaux en arcades ; D, cellule de type double bouquets ; E et I, cellules en paniers ; F, cellules de type chandelier ; G, neurones à touffes ; H, neurones de type neurogliaforme.

Les neurones non épineux (**Figure 11C-I**) sont des interneurons majoritairement inhibiteurs GABAergiques. Ces cellules présentent une vaste diversité morphologique, moléculaire et électrophysiologique. Les principaux interneurons sont les cellules en panier et en chandelier exprimant la Parvalbumine (PV) qui représentent 30-50% des interneurons,

et les cellules de type Martinotti exprimant la somatostatine (SOM) et qui représentent 40% des interneurons. Le reste des interneurons sont représentés par des cellules exprimant le peptide vaso-intestinal (VIP) ainsi que par les cellules neurogliaformes.

Les interneurons en panier (PV) projettent leurs axones principalement sur le soma et la partie proximale des dendrites de leurs cellules cibles. Ces interneurons ont tendance à se ramifier localement, au sein d'une colonne corticale plutôt qu'à travers plusieurs colonnes.

Les interneurons en chandeliers sont des cellules particulières au sens où elles seules projettent leurs axones vers le segment initial de l'axone du neurone cible. Cette propriété leur confère la particularité d'empêcher la genèse d'un potentiel d'action en hyperpolarisant l'axone, sans modifier les propriétés intégratives du neurone cible. Cette connectivité permet ainsi de réduire les effets des boucles de rétrocontrôle positif induites par les connexions réciproques excitatrices extrêmement nombreuses dans le cortex. Ces cellules peuvent contacter 60 à 80 neurones cibles et sont retrouvées à travers toutes les couches corticales. Ces cellules expriment également la parvalbumine (pour revue : Harris and Mrsic-Flogel, 2013).

Les interneurons à somatostatine (majoritairement des cellules de Martinotti) ciblent préférentiellement les dendrites distales des neurones pyramidaux ainsi que celles des interneurons inhibiteurs (notamment à parvalbumine). Les cellules à somatostatine sont essentiellement contactées par des neurones excitateurs locaux et inhibées majoritairement par des interneurons exprimant le VIP (**Figure 12**) (Pfeffer et al., 2013).

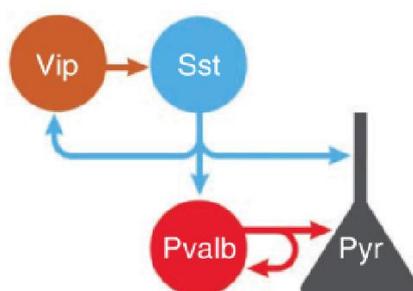


Figure 12 : Schéma des connexions corticales inhibitrices des trois principales classes d'interneurones. Tiré de [Pfeffer et al., 2013].

VIP : interneurons à peptide vaso-intestinal ; Sst : interneurons à somatostatine ; Pvalb : interneurons à parvalbumine ; Pyr : neurones pyramidaux. Seules les principales connexions inhibitrices sont schématisées.

Au début des années 80, avec l'avènement des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires *in vitro* (Connors and Gutnick, 1990) sur des préparations de tranches de cerveau, et *in vivo* sur des animaux anesthésiés (Nuñez et al., 1993), les neurones corticaux

ont été séparés en quatre classes qui diffèrent radicalement par leurs patrons de décharges en réponse à des injections de courant dépolarisant.

Les neurones de type *Regular spiking* (**Figure 13** ; RS), essentiellement excitateurs (glutamatergiques), répondent à une dépolarisation soutenue par des trains continus de potentiels d'action (40 à 80Hz) avec une adaptation fréquentielle plus ou moins rapide. Les neurones de type *Fast Spiking* (**Figure 13** ; FS), majoritairement inhibiteurs (GABAergiques), répondent à des injections de courants dépolarisants par des décharges toniques de potentiels d'action courts (<1 ms) et à haute fréquence (jusqu'à 400 Hz) qui ne présentent pas d'adaptation. Ces deux grandes classes correspondant respectivement à des neurones excitateurs et inhibiteurs sont retrouvées dans toutes les couches corticales (II à VI). Les neurones de type *Intrinsic bursting* (IB ; **Figure 13** ; IB), qui sont pour la plupart des neurones excitateurs, génèrent des décharges en bouffées de potentiels d'action (ou "burst"). Ces bouffées sont généralement composées de 2 à 5 potentiels d'action qui s'inactivent progressivement, et sont sous-tendues par de larges dépolarisations membranaires. Les premières données obtenues *in vitro* (Connors et al., 1982; McCormick et al., 1985; Agmon and Connors, 1989) suggéraient que les neurones de type IB sont spécifiquement présents dans les couches profondes du néocortex, mais des travaux ultérieurs réalisés *in vivo* dans le cortex du chat ont montré la présence de ces neurones dans toutes les couches corticales (Nowak et al., 2003). Au vu de leur comportement oscillatoire, il avait été initialement proposé que les neurones de type IB pourraient jouer un rôle prépondérant dans la rythmogénèse corticale et en particulier dans la genèse des oscillations à ondes lentes observées durant le sommeil à ondes lentes et dans certaines phases de l'éveil (<10 Hz) (pour revue : Steriade, 2004).

Plus récemment, une quatrième classe de neurones de type *Chattering cells* qui répondent à l'injection d'un courant dépolarisant par des bouffées de potentiels d'action à haute fréquence (jusqu'à 800 Hz) générés de manière rythmique (40-80 Hz) a été mise en évidence. Les bouffées peuvent se terminer par une dépolarisation sous liminaire caractéristique, appelée *after depolarization* (ADP). Initialement découverts dans les couches superficielles du cortex visuel primaire du chat par Gray et McCormick (Gray and McCormick, 1996), plusieurs études suggèrent que ces neurones jouent un rôle dans la genèse d'oscillations corticales synchrones dans des gammes de fréquences bêta/gamma (20-80 Hz) évoquées par les stimulations visuelles. Par la suite, le groupe de Steriade (Steriade et al., 1998) a mis en évidence des neurones au comportement similaire qu'il appela *Fast*

rhythmic bursting (**Figure 13** ; FRB) dans les couches profondes du cortex moteur et associatif du chat. Certains d'entre eux ont été histologiquement identifiés comme étant des neurones cortico-thalamiques, suggérant leur importance dans la synchronisation des oscillations à haute fréquence dans les boucles cortico-thalamo-corticales.

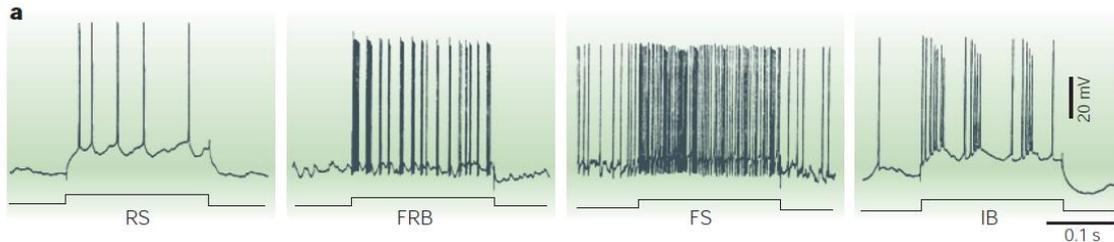


Figure 13 : Les 4 grandes classes électrophysiologiques des neurones corticaux, adapté de [Steriade, 2004].

(RS) : Regular Spiking répondant à l'injection d'un créneau de courant dépolarisant par un train de potentiels d'actions continus avec adaptation fréquente.

(FRB) : Fast-Rhythmic-Bursting répondant par des bouffées rythmiques de potentiels d'actions à très haute fréquence.

(FS) : Fast Spiking répondant par un train continu de potentiels d'action à haute fréquence sans adaptation.

(IB) : Intrinsic Bursting répondant par des bouffées de potentiels d'action caractérisées par une accommodation de l'amplitude des potentiels d'action.

Existe-t-il une corrélation entre les différents paramètres qui caractérisent un neurone (morphologie, profil de décharge, distribution laminaire) ? Quel que soit l'angle sous lequel cette question est abordée, il est extrêmement difficile d'établir une corrélation franche. Les interneurons GABAergiques présentent une grande variété de morphologies (double bouquets, cellules en paniers, chandeliers, etc.) et différents profils d'expression moléculaires (PV, SOM, VIP, neuropeptide Y etc.) qui ne se recoupent pas. Par exemple, les interneurons à PV peuvent être des cellules en chandelier ou en panier. Par ailleurs, bien que la majorité des interneurons soit de type FS exprimant la PV, les autres interneurons possèdent des propriétés intrinsèques très variées (pour revue : Ascoli et al., 2008) rendant leur classification d'autant plus complexe. Ces neurones sont retrouvés à travers toutes les couches du cortex (à l'exception des neurones VIP retrouvés principalement dans les couches II/III). Concernant les neurones glutamatergiques, les neurones de type RS peuvent être des cellules épineuses étoilées ou des cellules pyramidales. Toutes les cellules pyramidales ne sont pas nécessairement de type RS, et peuvent présenter ainsi des propriétés intrinsèques caractéristiques des IB, FRP ou encore des FS. Il n'est donc pas possible de déterminer la morphologie d'un neurone en se basant uniquement sur ses propriétés intrinsèques, et inversement. La distribution laminaire des différents types de neurones n'est pas spécifique. À l'exception des cellules épineuses étoilées glutamatergiques présentes dans la couche 4, la plupart des neurones sont retrouvés à travers les différentes couches du cortex.

Ainsi, la classification des neurones corticaux sur la base de leur morphologie, leurs propriétés intrinsèques et leur profil d'expression génique est très difficile à réaliser. En effet, ces catégories ne sont pas robustes dès lors que tous les paramètres sont pris en compte. Il est tout de même nécessaire d'utiliser ces différentes caractéristiques pour décrire comment les neurones corticaux sont connectés.

3. Connectivité fonctionnelle excitatrice du cortex à tonneaux

L'avantage du cortex à tonneaux est de pouvoir visualiser anatomiquement une colonne corticale, associée à une vibrisse principale. Il est ainsi possible, *in vitro*, de réaliser des enregistrements intracellulaires de type Patch-clamp en configuration « cellule entière » de plusieurs paires de neurones au sein d'une même colonne de manière systématique. L'imagerie intrinsèque permet d'identifier, *in vivo*, la colonne corticale correspondant à la vibrisse stimulée : la stimulation induit une réponse hémodynamique dans la zone du cortex à tonneaux recevant les informations sensorielles tactiles en provenance de la vibrisse stimulée. Cette approche offre la possibilité de colorer spécifiquement une colonne corticale cible avec un marqueur membranaire fluorescent (DYE) puis, après extraction du cerveau, de réaliser des expériences *in vitro* dans la même colonne de manière reproductible (Lefort et al., 2009). D'autres techniques permettent d'étudier la connectivité fonctionnelle corticale, comme le *Laser Scanning Photostimulation* qui repose sur la photolyse de glutamate encagé pendant des enregistrements intracellulaires *in vitro* (Katz and Dalva, 1994). Ceci permet de construire une carte détaillée de la disposition spatiale ainsi que de la force des entrées synaptiques qui convergent sur le neurone enregistré. L'avantage de cette technique, outre la bonne résolution spatiale, est de pouvoir stimuler différentes zones contenant potentiellement des afférences pré-synaptiques. Les neurones épineux étoilés représentent environ 80% des neurones excitateurs de la couche 4 du barrel cortex (Lefort et al., 2009), les 20% restant étant des neurones pyramidaux (petites pyramides et pyramides étoilées). Ces neurones sont densément innervés par des projections en provenance du VPM et reçoivent des signaux excitateurs de faibles latences. Bien que cette synapse thalamo-corticale soit peu efficace (l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs PPSE est d'environ 1 mV), l'abondance et la synchronie des entrées synaptiques convergentes (environ 85 axones thalamiques par neurone épineux étoilé) sont suffisantes pour activer les neurones de la couche 4 (Bruno and Sakmann, 2006).

La connexion récurrente entre neurones excitateurs de la couche 4 est l'une des plus fortes et abondantes connexions synaptiques cortico-corticales (Feldmeyer et al., 1999; Lefort et al., 2009). Cette connexion L4-L4 représente la quasi-majorité des entrées excitatrices intracorticales que reçoivent les neurones épineux étoilés.

Dans la plupart des études, les couches 2 et 3 du cortex ont été regroupées et considérées comme une pseudo-couche uniforme, notamment à cause de la difficulté de les distinguer anatomiquement. Les neurones excitateurs des couches 2/3 sont majoritairement des cellules pyramidales (plus petites que celles des couches infragranulaires) et reçoivent une projection excitatrice directe et unidirectionnelle en provenance des neurones épineux étoilés de la couche 4 (Bureau et al., 2004; Lefort et al., 2009; Hooks et al., 2011). Toutefois certaines études ont montré qu'il existe quelques différences dans les profils de connexions que reçoivent les neurones de la couche 2 et de la couche 3. Les latences des réponses sensorielles à la stimulation d'une vibrisse principale sont plus longues dans la couche 2, alors qu'elles sont comparables à celles des couches 4 et 5 dans la couche 3 (Brecht and Sakmann, 2002; Brecht et al., 2003; Manns et al., 2004). Les zones de projections axonales des neurones thalamo-corticaux (VPM) semblent recouvrir la région des dendrites baso-latérales des neurones de la couche 3, ce qui suggère une projection thalamique directe dans la couche 3 (bordure inférieure) en adéquation avec les latences des réponses sensorielles mesurées (Bureau et al., 2006; Oberlaender et al., 2012). Il a été également montré que les neurones de la couche 3 reçoivent des connexions excitatrices plus fortes en provenance des cellules épineuses étoilées de la couche 4 que les neurones de la couche 2 (Bureau et al., 2004). D'autre part, les neurones de la couche 2 envoient moins de projections vers la couche 3 qu'ils n'en reçoivent de cette dernière (Bureau et al., 2004). Enfin il semblerait que l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de la couche 2 nommés « pyramides à larges touffes » diffère de celle de la couche 3 (« pyramide à touffes minces ») dans sa largeur et sa densité (Shepherd and Svoboda, 2005; Feldmeyer et al., 2006). Cette distinction morphologique s'accompagne d'une différence dans les entrées cortico-corticales excitatrices que reçoivent ces neurones. Quelques études suggèrent en effet que les pyramides à larges touffes de la couche 2 sont contactées par des projections thalamiques en provenance du POM (qui arrivent au niveau de la couche 1), ainsi que par des neurones pyramidaux de la partie supérieure de la couche 5 (L5A-L2_{septum}) (Shepherd and Svoboda, 2005; Shepherd et al., 2005; Bureau et al., 2006). Les auteurs proposent que ces différentes connectivités corticales, convergeant toutes deux vers la couche 2, soient la continuité des voies lemniscale (passant

par une colonne relative à un barrel L4-L3-L2) et paralemniscale (passant par une colonne septale P0m-L2 ; L5A-L2).

En ce qui concerne les projections interlaminaires, la connectivité excitatrice entre les couches 2/3 et la couche 5 est bidirectionnelle. Bien qu'il ait été suggéré que l'intégration sensorielle repose sur une activation séquentielle des couches 2/3 puis de la couche 5, il est à noter que la connexion réciproque L5-L2/3 ne sert pas uniquement de rétrocontrôle, mais peut être également impliquée dans la propagation de l'activité spontanée des neurones corticaux qui semble être générée d'abord dans la couche 5 (Sakata and Harris, 2009).

Les neurones excitateurs des couches 2/3 ont globalement deux patrons de connexions cortico-corticales. Des connexions dites « verticales » translaminaires puisqu'ils projettent vers les couches infragranulaires comme la couche 5 et la couche 6 (Lefort et al., 2009), mais émettent également des projections « horizontales » intralaminaires. Ces connexions peuvent être locales et restreintes à une colonne ou bien distales et s'étendre sur plusieurs colonnes d'une même aire corticale. En effet, une partie des neurones pyramidaux des couches 2/3 projette notamment vers des aires corticales motrices (M1) et sensorielles de second ordre (S2) ipsi- et/ou controlatérale (Ferezou et al., 2007; Sato and Svoboda, 2010; Chen et al., 2013; Yamashita et al., 2013).

La couche 5 présente des neurones pyramidaux pouvant se diviser en deux grandes catégories en fonction de leurs projections axonales : les neurones intra-télecéphalique (IT) qui forment des connexions cortico-corticales essentiellement vers les couches 2/3 et 6 (Lefort et al., 2009), vers le striatum (Anderson et al., 2010; Pidoux et al., 2011) et vers d'autres structures télecéphaliques comme l'amygdale. Les autres neurones de cette couche est constituée par les neurones du tractus pyramidal (TP, ou faisceau pyramidal) qui projettent vers des structures sous-corticales et plus particulièrement la corne antérieure de la moelle épinière, mais également de manière non négligeable vers la couche 6 du cortex. Le thalamus et plus particulièrement la partie dorsale du P0m est également une zone de projection des neurones pyramidaux de la couche 5 (Veinante et al., 2000b). C'est à ce titre que la couche 5 est communément appelée « couche de sortie » du cortex.

Du point de vue morphologique, il existe principalement deux types de neurones excitateurs pyramidaux plus ou moins ségrégués dans des subdivisions de la couche 5 (L5A et L5B) : les neurones à touffes dendritiques minces *slender tufted* qui sont majoritairement retrouvés dans la couche 5A, mais également en de plus faibles proportions dans la couche 5B, et les neurones pyramidaux à touffes dendritiques épaisses *thick tufted*, retrouvés dans la

couche 5B et qui présentent une bifurcation de leur dendrite apicale au niveau des couches 2/3 pour former deux touffes de dendrites (Oberlaender et al., 2012). Ces deux types de neurones reçoivent des afférences thalamiques (Oberlaender et al., 2012). La principale afférence corticale translaminaire des neurones de la couche 5 provient des neurones excitateurs des couches 2/3. Les neurones pyramidaux IT et TP forment entre eux des connexions excitatrices asymétriques. Par exemple, il a été montré dans le cortex visuel de la souris que les fréquences de connexions synaptiques entre les neurones cortico-striataux (IT) sont significativement plus grandes que les connexions entre les neurones cortico-corticaux (IT) ou cortico-tectaux (TP) (Brown and Hestrin, 2009; Lefort et al., 2009). Des différences similaires ont été retrouvées parmi des paires de neurones hétérologues, si bien que les neurones cortico-corticaux connectent préférentiellement les neurones cortico-tectaux tandis que la connexion réciproque est moins fréquente (**Figure 14**) (Brown and Hestrin, 2009; Lefort et al., 2009).

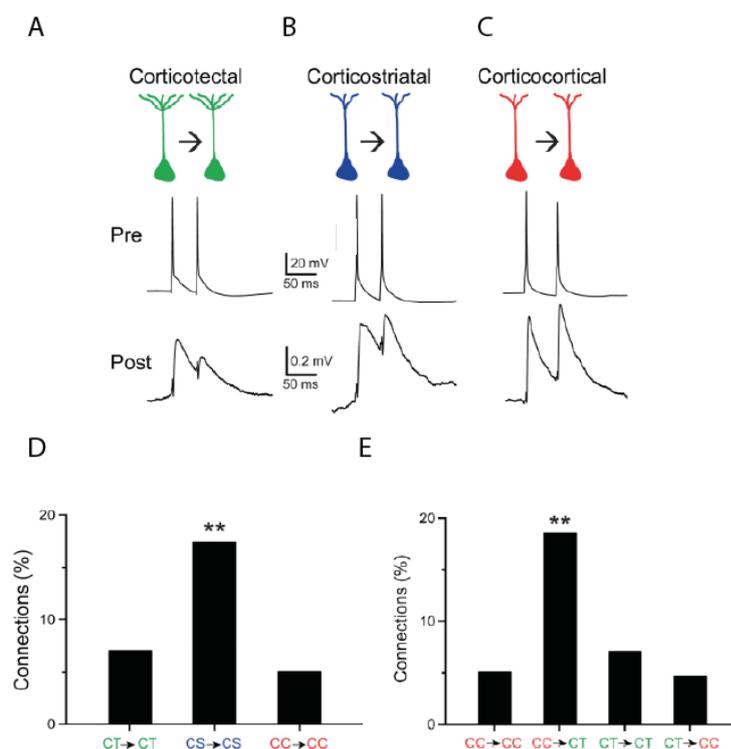


Figure 14 : Différentes fréquences de connexions monosynaptiques entre des neurones pyramidaux de la couche 5. Adapté de [Brown et al., 2009].

A-C) Les potentiels d'action d'un neurone pré-synaptique évoquent une réponse au niveau du neurone post-synaptique enregistré simultanément. Les neurones monosynaptiquement connectés sont A) des neurones cortico-tectaux (CT), B) des neurones cortico-striataux (CS) et C) cortico-corticaux (CC).

D-E) Représentations graphiques des fréquences de connexions monosynaptiques obtenues par des enregistrements en paires de neurones appartenant au même groupe (en D), et des neurones CC et CT formant des connexions hétérologues (en E).

Oberlaender et collaborateurs ont suggéré l'hypothèse d'une implication différentielle des neurones pyramidaux de la couche 5A et ceux de la couche 5B, en fonction de la tâche comportementale dans laquelle serait inscrit l'animal. Ils proposent que les neurones de la couche 5A à touffes dendritiques fines (*slender tufted*) véhiculent des informations quant au mouvement des vibrisses et projettent vers le cortex moteur M1 (Sato and Svoboda, 2010), alors que les neurones de la couche 5B à touffes dendritiques épaisses (*thick tufted*) sont activés lors du contact des vibrisses avec un objet (Oberlaender et al., 2011). La couche 5A est intriquée dans des connexions majeures de la voie paralemniscale (L2-L5A ; L5A-L2 ; POm-L5A), tandis que les neurones de la couche 5B semblent être principalement impliqués dans la voie lemniscale (L3-L5B ; VPM-L5B).

En ce qui concerne les neurones excitateurs de la couche 6, il est également possible de distinguer les neurones pyramidaux sur la base de leurs projections axonales : les neurones à projections cortico-corticales, et les neurones à projections cortico-thalamiques (VPM pour le système somatosensoriel) qui projettent également vers le noyau réticulé du thalamus (principale source d'inhibition du VPM) et vers la couche 4 ainsi que la couche 5A (Zhang and Deschênes, 1997; Thomson, 2010; Kim et al., 2014).

Ainsi, une large fraction des connexions cortico-corticales et cortico-fugales historiquement découvertes chez le chat ou le singe a été confirmée dans le cortex à tonneaux du rongeur (**Figure 15**). Par ailleurs, les neurones du cortex somesthésique primaire présentent des caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et fonctionnelles semblables à ce qui a été d'abord décrit dans le système visuel du chat. Les neurones (excitateurs et inhibiteurs) sont comparables dans leurs distributions laminaires à ce qui a été trouvé dans le cortex visuel du chat, et la connectivité canonique décrite une trentaine d'années plus tôt par Gilbert & Wiesel est belle et bien conservée chez le rongeur et l'ensemble de ces synapses a été anatomiquement et fonctionnellement quantifié. Il en résulte que le système des vibrisses chez le rongeur peut constituer un bon modèle pour étudier le rôle de la connectivité canonique dans le traitement sensoriel opéré par le cortex. Avant d'aborder cette question, le chapitre suivant vise à aborder les propriétés des réponses sensorielles des neurones du cortex à tonneaux.

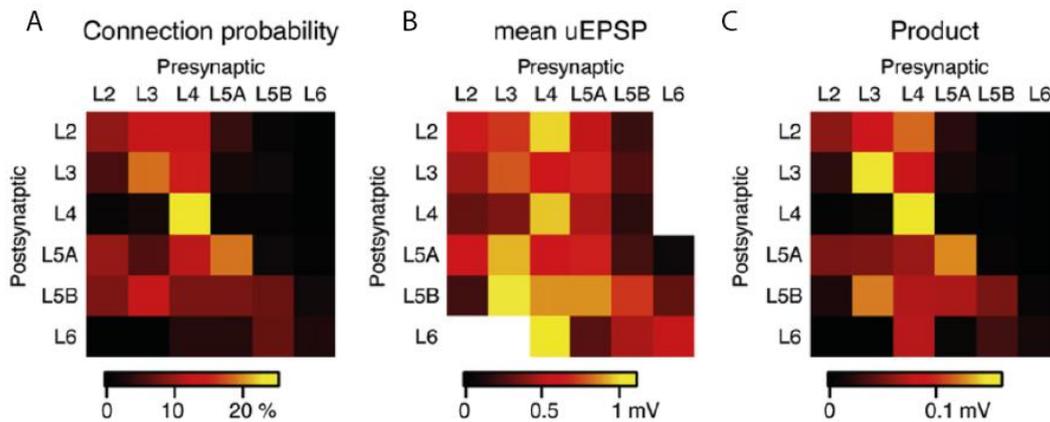


Figure 15 : Matrices de connectivité corticale au sein de la colonne C2 du cortex somesthésique primaire de la souris. Tiré de [Lefort et al., 2009]

A) Matrice de probabilités de retrouver des paires de connexions monosynaptiques excitatrices entre les neurones des différentes couches corticales.

B) Matrice équivalente montrant l'amplitude du potentiel post-synaptique moyen (uEPSP) évoqué par l'élément pré-synaptique.

C) Le produit de la probabilité de retrouver une connexion monosynaptique et l'amplitude des uEPSP apporte une estimation de l'impact d'une connexion corticale spécifique en fonction de la couche au sein d'une colonne corticale.

4. Intégration sensorielle dans le système des vibrisses

Après avoir décrit la connectivité corticale de l'aire somatosensorielle primaire du rongeur, il est primordial de savoir comment une information sensorielle se propage jusqu'au cortex lors de la stimulation d'une vibrisse. Je me propose dans les paragraphes qui suivent de détailler l'organisation des champs récepteurs ainsi que les différents paramètres de stimulations auxquels les neurones du cortex à tonneaux peuvent être sensibles.

Les champs récepteurs des neurones du cortex à tonneaux.

Chaque vibrisse possède un follicule innervé par 70-170 neurones pseudo-monopolaires dont le corps cellulaire se trouve au niveau des ganglions trigéminaux. Les récepteurs sensoriels aux terminaisons de ces afférences sensorielles (disques de Merkel, corpuscules de Ruffini, et terminaisons nerveuses libres) sont activés par des déflexions mécaniques de la vibrisse et génèrent des trains de potentiels d'action fiables et temporellement précis, dont la fréquence varie avec l'amplitude, la vitesse et la direction de la déflexion d'une vibrisse (Jacquin et al., 1993; Jones et al., 2004). Ces afférences sensorielles se projettent vers le complexe trigéminal, où elles envoient des branches collatérales à la fois au niveau du Pr5 ainsi qu'au niveau du Sp5. Les neurones du Pr5 ont une

arborisation dendritique spatialement confinée et innervée par les fibres afférentes d'une seule et unique vibrisse (Veinante and Deschenes, 1999). Au contraire, les neurones du Sp5 ont une arborisation plus étendue et reçoivent des entrées sensorielles convergentes en provenance de plusieurs vibrisses voisines. Les enregistrements électrophysiologiques des réponses sensorielles au niveau des neurones du Pr5 chez les animaux profondément anesthésiés suggèrent que les champs récepteurs de ces neurones sont limités à une seule et unique vibrisse, la vibrisse principale (Veinante et al., 2000a). D'autres études ont quant à elles proposé un champ récepteur constitué de plusieurs vibrisses au niveau des neurones du Pr5 lorsque les animaux sont plus faiblement anesthésiés (Minnery and Simons, 2003a).

Au niveau du thalamus, les champs récepteurs sont hérités de leurs fibres trigéminales afférentes : les neurones du VPM qui sont innervés principalement par les fibres en provenance du Pr5 répondent fortement à la déflexion de leur vibrisse principale correspondante, et de manières plus faibles aux vibrisses adjacentes (Simons and Carvell, 1989; Diamond et al., 1992; Nicolelis and Chapin, 1994; Brecht and Sakmann, 2002). Les neurones thalamiques du POn ont des champs récepteurs plus larges dérivés de leurs afférences en provenance du Sp5 (Diamond et al., 1992). Les collatérales des fibres thalamo-corticales efférentes du VPM projettent vers le noyau réticulé inhibiteur du thalamus (NRT), qui est une source d'inhibition divergente (inhibition latérale) et d'inhibition en-retour (*Feedback inhibition*).

À l'instar des neurones du VPM, les neurones de la couche 4 situés à l'intérieur d'un tonneau présentent un champ récepteur, centré sur leur vibrisse principale qui évoque la réponse de plus forte amplitude et de plus faible latence (**Figure 16A-B**) (Simons, 1978; Simons and Carvell, 1989; Moore and Nelson, 1998; Roy et al., 2011). La stimulation des différentes vibrisses pendant l'enregistrement extracellulaire des réponses supraliminaires d'un neurone de la couche 4 (**Figure 16C**) permet ainsi d'identifier la vibrisse principale sur la base des latences et des amplitudes des réponses sensorielles (**Figure 16D**). Il apparaît également que les réponses sous-liminaires révèlent des champs récepteurs plus larges que les réponses supraliminaires (**Figure 16B vs 16D**).

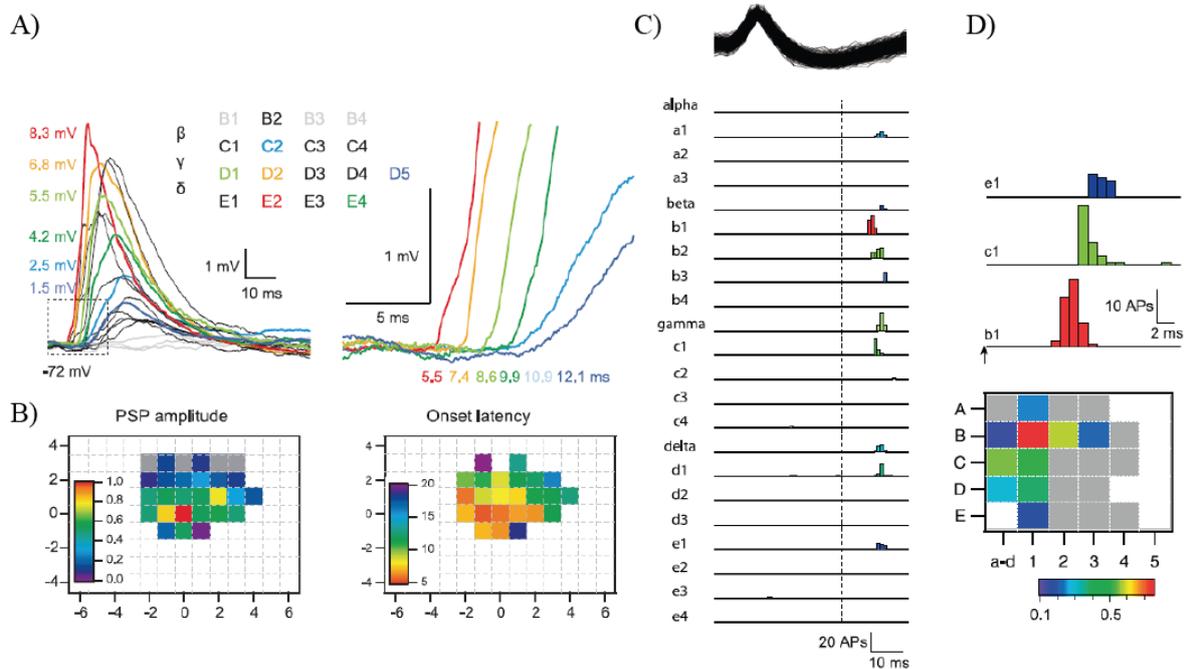


Figure 16 : Caractéristiques des réponses sensorielles aux stimulations de différentes vibrisses au niveau des neurones de la couche 4 du cortex somesthésique. Tiré de [Roy et al., 2011]

A) Traces brutes de l'enregistrement intracellulaire d'un neurone de type regular spiking de la couche 4 du barrel cortex. À gauche, amplitude des potentiels post-synaptiques évoqués par la stimulation de plusieurs vibrisses (carte topographique au centre). À droite, élargissement des traces de gauche mettant en évidence les temps de latence des réponses sensorielles. Sur la base de la réponse synaptique la plus ample (8.3 mV) et de plus faible latence (5.5 ms), il est possible d'identifier la vibrisse principale E2 (en rouge).

B) Représentation matricielle des amplitudes des potentiels synaptiques (code couleur indiquant les amplitudes relatives en mV) évoqués par la stimulation des différentes vibrisses (à gauche) normalisés par rapport à la réponse à la vibrisse principale (en rouge). À droite, latences des réponses sous-liminaire observées en A. (code couleur indiquant les latences en ms). Les axes correspondent aux distances relatives entre la vibrisse principale et les autres vibrisses selon l'axe rostro-caudal (abscisses) ou dorso-ventral (ordonnées).

C) Enregistrement extracellulaire d'un neurone supposé de type regular spiking de la couche 4 du barrel cortex (waveforme en haut). En dessous, histogrammes des réponses supraliminaire (nombre de potentiels d'action évoqués par 30 stimulations) aux stimulations des différentes vibrisses.

D) Agrandissement de certains histogrammes en C). C'est la vibrisse B1 (en rouge) qui évoque le plus de potentiels d'action et avec la plus faible latence. En dessous, représentation matricielle des réponses supraliminaire du neurone à la stimulation des différentes vibrisses (le code couleur indiquant le nombre moyen de potentiels d'action par stimulation).

Au niveau des neurones corticaux, la réponse évoquée par la stimulation de la vibrisse principale est caractérisée par une séquence d'activation de conductances excitatrices (pouvant conduire ou non à la genèse d'un potentiel d'action), puis inhibitrices induites par l'activation des interneurons locaux (**Figure 17**) (Wilent and Contreras, 2004, 2005).

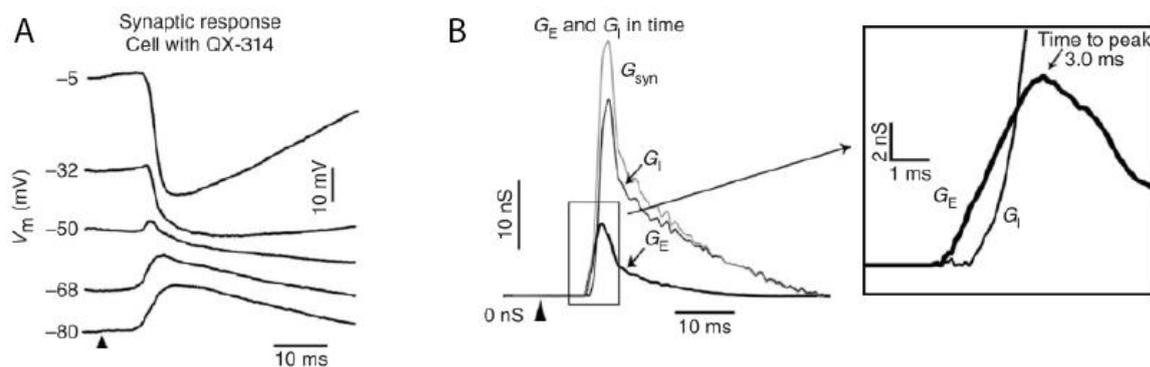


Figure 17 : Les réponses sensorielles sont sous-tendues par l'activation de conductances excitatrices et inhibitrices au niveau des neurones corticaux. Adapté de [Wilent & Contreras, 2005].

A) Réponses sensorielles synaptiques d'un neurone de la couche 4 du cortex somesthésique à 5 niveaux de potentiels membranaires. L'injection intracellulaire de QX-314 empêche l'émission de potentiels d'action par le neurone, révélant ainsi les événements sous-liminaire qui sous-tendent les réponses sensorielles. La flèche symbolise le début de la stimulation sensorielle. A -32 et -50 mV, la réponse sensorielle synaptique est caractérisée par une dépolarisation du potentielle de membrane rapide et peu ample, suivie d'une plus large hyperpolarisation. La phase de dépolarisation diminue en amplitude lorsque le potentiel de membrane est maintenu à un état plus dépolarisé (-5 mV). Ceci s'explique par le fait que l'état de polarisation membranaire se rapproche du potentiel d'inversion des conductances excitatrices (aux alentours de 0 mV) et donc d'une diminution de la *driving force*. En suivant un raisonnement similaire il est possible d'observer une inversion de la phase d'hyperpolarisation des réponses synaptiques donnant lieu à une dépolarisation, lorsque le potentiel de membrane est maintenu dans des gammes de potentiels plus hyperpolarisés -68 et -80 mV. Le potentiel d'inversion des conductances inhibitrices (essentiellement chlore) étant généralement aux alentours de -70 mV. Ces observations suggèrent donc fortement une activation séquentielle de conductances excitatrices et inhibitrices en réponse aux stimulations sensorielles.

B) Décomposition théorique des conductances synaptiques totales (G_{syn}) en conductances inhibitrices (G_i) et excitatrices (G_e). Ces conductances ont été estimées par la résolution des équations mathématiques décrivant la dynamique des variations du potentiel membranaire (voir méthodes). L'encadré est un agrandissement du début de l'activation des conductances excitatrices et inhibitrices, et met en exergue le décalage temporel de ces conductances : les auteurs suggèrent que la stimulation sensorielle induit l'activation d'abord des conductances excitatrices, puis inhibitrices.

Les neurones corticaux peuvent être plus ou moins sélectifs à certains paramètres de stimulation sensorielle. Il paraît évident que pour étudier la connectivité corticale il est préférable de se placer dans un contexte de stimulations sensorielles évoquant des réponses optimales. Il est également intéressant de pouvoir étudier l'évolution de la connectivité corticale fonctionnelle pour des stimuli non optimaux. Quelque soit la question abordée, il est nécessaire de déterminer les dépendances des réponses sensorielles aux différents paramètres de stimulation.

Dépendance des réponses sensorielles des neurones à la vitesse de la déflexion

Les enregistrements de l'activité des neurones corticaux en réponse à des stimuli tactiles de type « rampe-et-maintien » (*ramp-and-hold*) ont permis d'observer une

dépendance des réponses sensorielles à la vitesse des stimuli (Pinto et al., 2000; Wilent and Contreras, 2004). Cette sensibilité à la vitesse a été décrite entre autre par Wilent & Contreras en procédant à des enregistrements intracellulaires des neurones corticaux chez le rongeur anesthésié. Les auteurs ont réalisés des stimuli rampe-et-maintien à cinq vitesses de déflexions différentes (de $160^{\circ} \cdot s^{-1}$ à $1300^{\circ} \cdot s^{-1}$) sans modifier l'amplitude du stimulus. Ces enregistrements ont permis de mettre en évidence une augmentation de la fréquence de décharge des neurones corticaux en réponse à des stimuli dont la vitesse est de plus en plus grande (**Figure 18A**). Les deux stimulations avec les vitesses les plus faibles ($160^{\circ} \cdot s^{-1}$ et $350^{\circ} \cdot s^{-1}$) n'entraînent pas de réponses supraliminaire dans leurs conditions expérimentales. L'analyse plus détaillée des réponses synaptiques révèle d'une part que quelle que soit la vitesse de la stimulation, les réponses sous-liminaire sont caractérisées par la séquence excitation-inhibition décrite précédemment ; et d'autre part que l'augmentation de la fréquence de décharge observée pour des stimuli de vitesses croissantes, est sous-tendue par une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués par les stimulations sensorielles (**Figure 18B**).

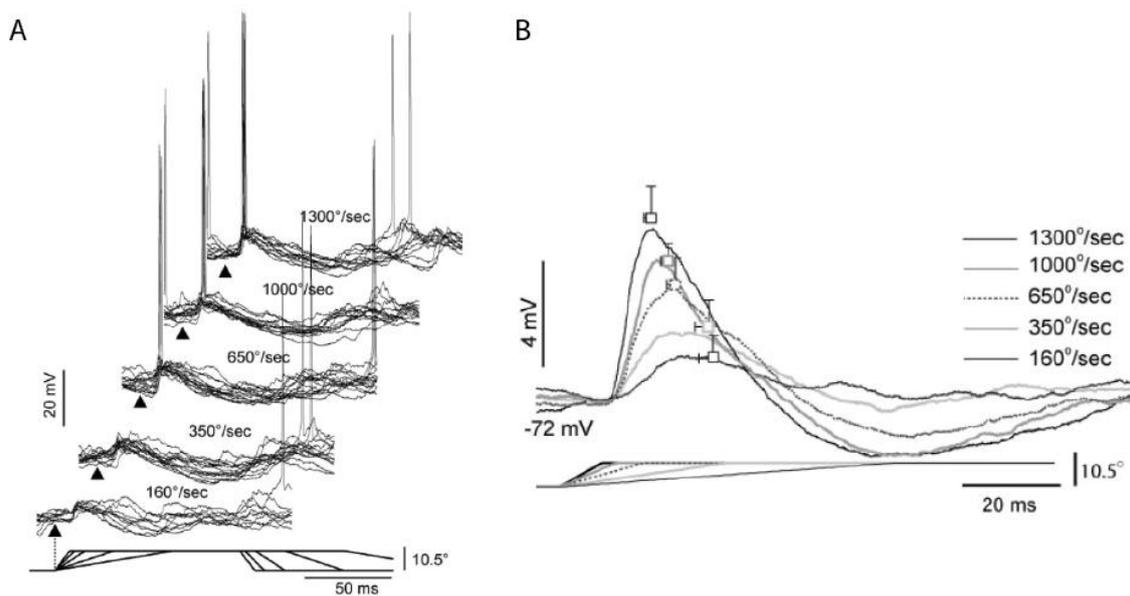


Figure 18 : L'amplitude des réponses sensorielles sous- et supraliminaire augmente avec la vitesse des stimuli sensoriels. Adapté de [Wilent & Contreras, 2004]

A) Traces d'enregistrements intracellulaires des réponses sensorielles superposées sur plusieurs essais ($n = 10-12$ essais) d'un neurone cortical pour chacune des vitesses de stimulations utilisées (la vitesse correspondante est notée au-dessus de chacune des superpositions). Les stimuli rampe-et-maintien correspondants sont figurés en bas, et les flèches noires indiquent le début de la stimulation.

B) Réponses synaptiques moyennes en fonction de la vitesse de déflexion. Les carrés blancs représentent les latences moyennes aux pics des potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués.

Sélectivité à la direction des neurones du cortex à tonneaux

Depuis les afférences sensorielles en provenance des vibrisses jusqu'aux neurones du barrel cortex, la sélectivité à la direction de la déflexion est une propriété commune à tous les neurones de ce système sensoriel. La sélectivité à la direction d'un neurone se traduit par une réponse sensorielle plus forte pour une déflexion de sa vibrisse principale dans une direction angulaire donnée (Simons and Carvell, 1989).

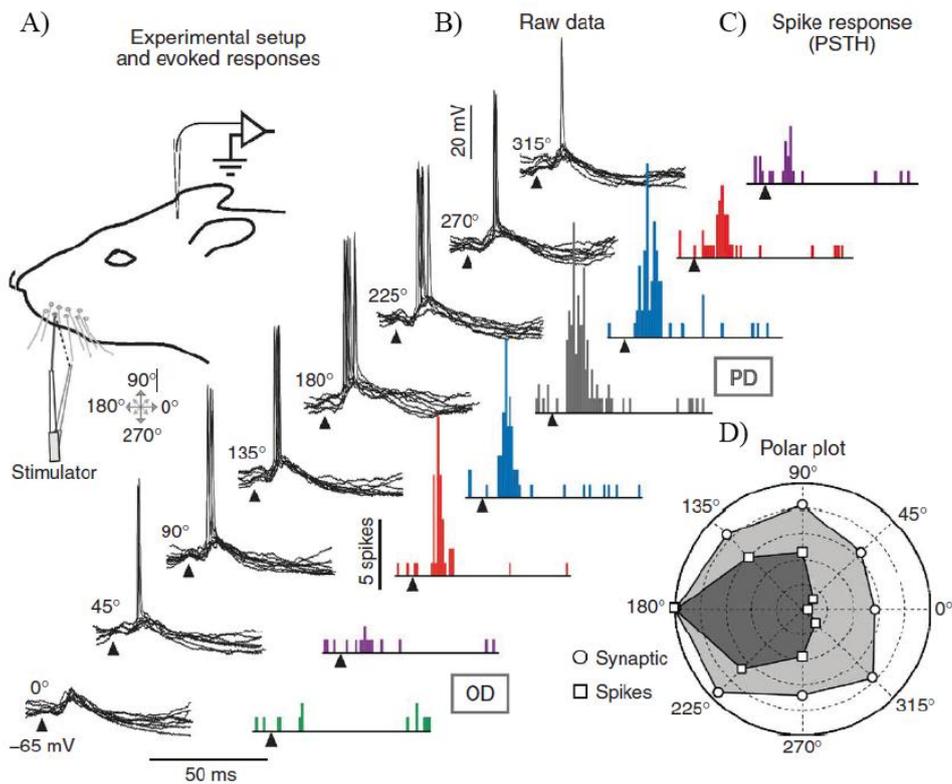


Figure 19 : Sélectivité à la direction d'un neurone de la couche 4. Tiré de [Wilent and Contreras, 2005].

A) Représentation schématique de la procédure expérimentale. Des enregistrements intracellulaires dans la couche 4 du cortex à tonneaux sont réalisés chez le rat anesthésié. La vibrisse principale du neurone enregistré est stimulée dans 8 directions.

B) Traces brutes des réponses intracellulaires aux stimulations de différentes directions permettant d'évaluer la fréquence de décharge (Hz) et l'amplitude des réponses synaptiques (mV). Chaque flèche indique le début de la stimulation.

C) Peri-stimulus Time histogram (PSTH), histogrammes comptabilisant le nombre de potentiels d'action (spikes) en réponse à plusieurs essais de stimulations de différentes directions. Chaque flèche indique le début de la stimulation.

D) Représentation polaire de l'amplitude des réponses sensorielles selon les différentes directions de stimulation. Ces réponses sensorielles sont représentées soit par la fréquence de décharge (carrés, «spikes»), soit par l'amplitude des événements synaptiques (cercles, «synaptic»). Les réponses supraliminaires (nombre de potentiels d'action) sont globalement plus sélectives que les réponses sous-liminaires (amplitude des potentiels synaptiques).

La sélectivité à la direction des afférences primaires est communément imputée à la distribution spatiale particulière des récepteurs (disques de Merkel) situés autour des follicules. Cette sélectivité est qualitativement conservée au niveau des noyaux trigéminaux (Lichtenstein et al., 1990) : elle se caractérise par des réponses plus fortes et de plus faibles latences pour la direction préférentielle (Bellavance et al., 2010).

Contrairement aux neurones thalamo-corticaux (VPM) qui sont sélectifs à la direction (Minnery and Simons, 2003b; Minnery et al., 2003) et aux neurones excitateurs de la couche 4 du cortex présentant une sélectivité similaire aux cellules du VPM (Simons and Carvell, 1989), les interneurons corticaux semblent être beaucoup moins sensibles à la direction de la déflexion (Simons and Carvell, 1989).

Au niveau du cortex, les réponses sensorielles supraliminaires (potentiels d'actions) sont plus sélectives à la direction que les réponses sous-liminaires (potentiels post-synaptiques) (**Figure 19B-D**) (Wilent and Contreras, 2005). La sélectivité des neurones corticaux est raffinée par des mécanismes de modifications de la dynamique temporelle des entrées excitatrices et inhibitrices (latences relatives). Pour la direction préférentielle, les conductances excitatrices précèdent les conductances inhibitrices. Cette différence temporelle s'amenuise lorsque la direction de la déflexion s'éloigne de la direction préférentielle, réduisant ainsi la fenêtre temporelle de l'excitation et donc la probabilité du neurone à décharger des potentiels d'action (Wilent and Contreras, 2005).

Adaptation des réponses sensorielles lors de stimulations vibratiles

Bien qu'étant une avancée considérable dans la compréhension des processus d'intégration sensoriels au niveau du cortex à tonneaux, les stimulations de type rampe-et-maintien ne reflètent pas le comportement des vibrisses durant l'exploration tactile (Carvell and Simons, 1990).

De récentes études comportementales ont démontré que dans des conditions éthologiques au cours desquelles les rongeurs mettent leurs vibrisses en mouvement et au contact de différentes textures, ces dernières étaient soumises à des micromouvements vibratiles (**Figure 20A-B**) dans une gamme de fréquences allant de 25 à 200 Hz (**Figure 20C**) (Ritt et al., 2008).

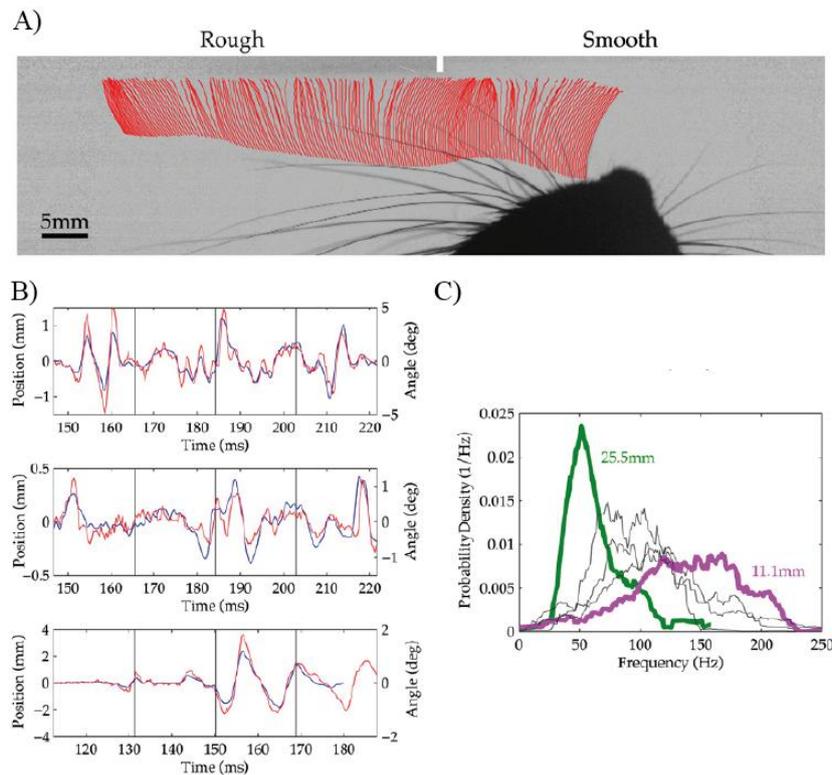


Figure 20 : Mouvements vibratiles des vibrisses au contact d'une surface lisse ou rugueuse. Tiré de [Ritt et al., 2008].

A) Cliché instantané tiré d'une vidéo à haute résolution temporelle au cours de laquelle un rat touchait une surface avec ses vibrisses. Les lignes rouges correspondent aux positions antérieures d'une vibrisse suivie au cours de la vidéo. La petite barre verticale blanche délimite la surface rugueuse de la surface lisse.

B) Trois exemples de vibrisses traquées pendant un contact avec une surface rugueuse en A. Les courbes rouges représentent l'angle de chaque vibrisse au cours du temps. Les courbes bleues représentent la position de chaque vibrisse au cours du temps.

C) Courbes représentant les densités spectrales des différentes fréquences auxquelles sont soumises les vibrisses.

Les fréquences des vibrations des vibrisses dépendent essentiellement de la nature de la texture et des propriétés mécaniques des vibrisses (longueur et épaisseur). En effet, ces activités sont liées au fait que les vibrisses sont soumises à des micromouvements appelés *slip-stick-ring* au cours desquels elles glissent sur la surface (*slip*), s'accrochent transitoirement (*stick*) puis oscillent temporairement lorsque la vibrisse se décroche de la surface (*ring*). Il a été proposé que la fréquence et l'amplitude de ces événements soient corrélées à la texture, et qu'ils puissent contribuer à l'encodage d'une surface en représentant à l'échelle des vibrisses la signature cinétique unique de la texture. Lors des enregistrements des neurones corticaux chez l'animal en comportement, Jadhav et collaborateurs ont proposé quant à eux que les micromouvements *slip-stick-events* des vibrisses au contact d'une texture étaient encodés par la structure temporelle des réponses sensorielles des neurones corticaux (Jadhav et al., 2009). Ainsi à chaque texture peut être associé un patron d'activité des

neurones corticaux temporellement précis et corrélé à la vélocité instantanée du mouvement de la vibrisse (Arabzadeh et al., 2005; Boloori et al., 2010).

Plusieurs études ont eu pour objectif d'identifier la manière dont les neurones corticaux encodent des stimuli vibratiles soutenus. En procédant à des stimulations sinusoïdales passives de différentes fréquences et amplitudes (mimant différentes « signatures cinétiques ») chez des animaux anesthésiés, Arabzadeh et collègues ont suggéré que les neurones corticaux encodent la fréquence et l'amplitude de stimulations vibratiles par leurs taux de décharge (Arabzadeh et al., 2003).

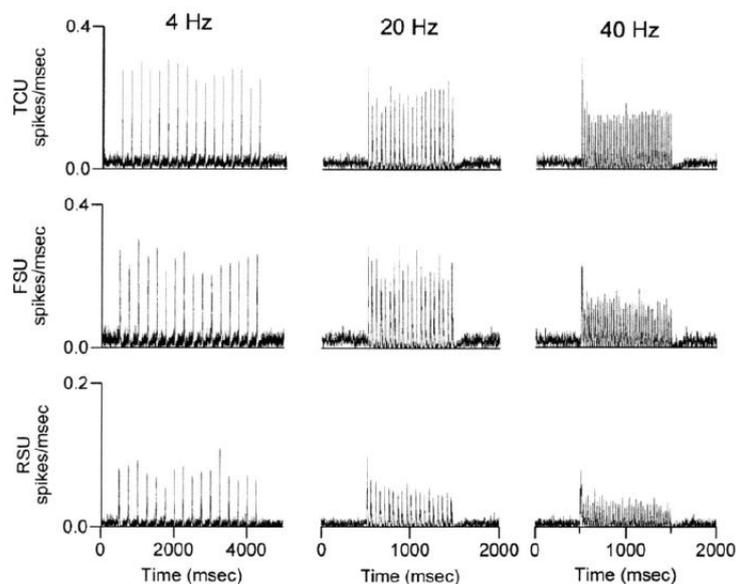


Figure 21 : Adaptation des réponses sensorielles des neurones thalamiques et corticaux, à différentes fréquences de stimulations. Tiré de [Khatri&Simons, 2004]

PSTHs d'une population de neurones (enregistrements extracellulaires) en réponse à des stimuli soutenus de la vibrisse principale à différentes fréquences (4 Hz, 20 Hz, 40Hz). Chaque ligne correspond à un type de population de neurones : TCU, neurones thalamo-corticaux (29 unités); FSU, neurones supposés inhibiteurs du barrel cortex (18 unités); RSU, neurones supposés excitateurs du barrel cortex (44 unités). À 20 Hz et 40 Hz, l'amplitude des réponses diminue après le premier cycle de stimulation (Adaptation).

Ces études au cours desquelles des stimulations vibratiles qui perdurent dans le temps étaient réalisées ont permis d'observer que les réponses sensorielles n'étaient pas constantes, mais s'adaptait au cours du temps. C'est-à-dire que la fréquence d'émission de potentiels d'action décroît au cours de la stimulation pour atteindre un état pseudo stable (ou *steady-state*). Ainsi, les neurones des noyaux trigéminaux, du thalamus (VPM, POm) et plus encore pour le cortex (neurones excitateurs et inhibiteurs) voient leurs activités diminuées après la

phase initiale de la réponse sensorielle (Ahissar et al., 2000; Khatri et al., 2004; Ganmor et al., 2010). L'amplitude de l'adaptation dépend de la fréquence de stimulation sensorielle : plus elle est élevée, plus l'adaptation est importante et elle s'observe à la fois sur le nombre de potentiels d'action et sur l'amplitude des potentiels post-synaptiques évoqués (**Figure 21**) (Khatri et al., 2004; Higley and Contreras, 2006). Cette adaptation est expliquée par une réduction concomitante et proportionnelle des entrées excitatrices et inhibitrices (Higley and Contreras, 2006).

Ollerenshaw et collaborateurs ont émis l'hypothèse que l'adaptation peut modifier les performances d'un rongeur à détecter ou discriminer des stimuli tactiles. Ils ont entraîné des rats à i) détecter des déflexions de vitesses croissantes d'une vibrisse cible avec et sans adaptation (**Figure 22C**) et ii) à identifier la vibrisse stimulée parmi deux vibrisses voisines stimulées aléatoirement, avec et sans adaptation (**Figure 22E**).

En condition non adaptée, la stimulation de l'une ou l'autre des vibrisses voisines conduit à une réponse sensorielle dans la colonne corticale correspondante, et s'étend aux colonnes adjacentes (**Figure 22A**). Ceci entraîne un recouvrement des régions corticales activées pouvant conduire à une ambiguïté pour l'animal à discriminer la vibrisse stimulée. L'adaptation entraîne quant à elle une réduction de la taille des champs récepteurs des deux vibrisses (**Figure 22B**), de telle sorte que la discrimination spatiale est potentiellement augmentée (Ollerenshaw et al., 2014; Ramirez et al., 2014).

Les auteurs ont ensuite évalué les effets de l'adaptation sur les capacités de l'animal à détecter ou discriminer les stimuli tactiles. Les auteurs ont mis en évidence que l'adaptation sensorielle entraîne une augmentation du seuil de perception du stimulus tactile (**Figure 22C-D**), c'est-à-dire qu'il faut réaliser des stimulations de plus fortes vitesses pour obtenir un même niveau de performance que dans la condition sans adaptation. À l'inverse les performances de l'animal à reconnaître laquelle des deux vibrisses était stimulée, ont été significativement améliorées après le protocole d'adaptation (**Figure 22E-F**) (Ollerenshaw et al., 2014).

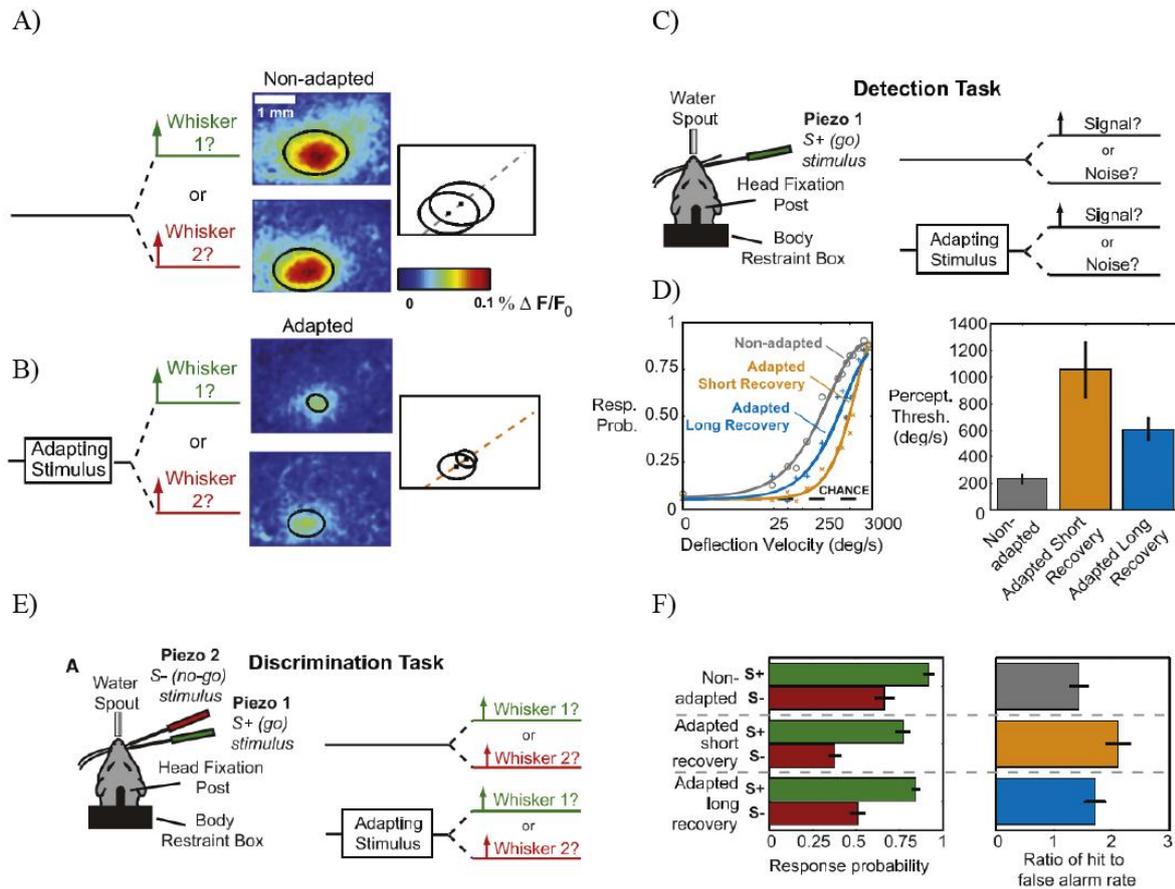


Figure 22 : Effets de l'adaptation sur la taille des champs récepteurs et sur les performances cognitives du rat. Adapté de [Ollerenshaw et al., 2014].

A) Imagerie optique des réponses corticales (Voltage sensitive dye, moyenné sur 50 essais) à la stimulation de deux vibrisses adjacentes (l'une ou l'autre séparément), sans adaptation préalable. Les ellipses noires représentent un fit gaussien à deux dimensions reproduites sur le graphique de droite, qui montre le recouvrement des régions corticales activées.

B) Même protocole qu'en A. sauf que les stimulations des vibrisses étaient cette fois précédées d'une stimulation à 10 Hz de la vibrisse correspondante. La taille des régions corticales activées a été significativement réduite.

C) Paradigme expérimental d'une tâche de détection de stimulation. Un stimulateur piézo-électrique est placé sur une vibrisse, et un stimulus de vitesse variable était présenté de manière aléatoire dans le temps. Ce stimulus était précédé, dans 50% des essais, par un stimulus induisant une adaptation (stimulation sinusoïdale à 12 Hz).

D) À gauche, courbes psychométriques moyennées de tous les animaux testés avec la condition non adaptée (en gris), adaptée avec une courte récupération (orange) et adaptée avec une longue récupération (bleue). La ligne pointillée représente le niveau de performance due à la chance. L'adaptation décale vers la droite le seuil des courbes psychométriques témoignant d'une augmentation du seuil de détection. Une période de longue récupération (quelques secondes) permet de se rapprocher des performances contrôles. À droite, quantifications des seuils de perception, mesurés au point à 50% des courbes sigmoïdales (EC50). Les conditions adaptées sont toutes significativement différentes de la condition non adaptée. Donc l'adaptation détériore de manière significative les performances de détection (moins sensible aux stimuli de faible intensité).

E) À gauche, paradigme expérimental de type «go/no-go» d'une tâche de discrimination. Un deuxième stimulateur piézo-électrique est positionné sur une vibrisse adjacente. Le protocole consiste à stimuler à un essai donné soit la vibrisse S+ (vibrisse «go») soit la vibrisse S- (vibrisse «no-go») avec une probabilité égale et une vitesse fixe. Les performances de l'animal à reconnaître S+ sont comparées à une condition adaptée (comme protocole précédent).

F) À gauche, probabilités de réponse (S+ en vert vs S- en rouge) dans les trois conditions utilisées dans la tâche de détection (contrôle, adaptée avec récupération courte, adaptée avec récupération longue). À droite, quantification des performances de discrimination dans les trois conditions. L'adaptation améliore de manière significative les performances de discrimination.

Distribution laminaire des réponses sensorielles.

Après avoir décrit la sélectivité des neurones du cortex à tonneaux, il convient désormais de comparer et de tester la robustesse du modèle canonique de la connectivité corticale initialement décrit chez le chat. En particulier la distribution laminaire des réponses sensorielles permet d'appréhender en partie l'organisation fonctionnelle de la connectivité corticale interlaminaire.

De manière surprenante, les enregistrements intracellulaires *in vivo* indiquent que les latences des réponses des neurones des couches 4 et 5 sont comparables lors de stimulations de type rampe-et-maintien. Ainsi, les neurones des couches 2/3 sont recrutés après ceux de la couche 5 (**Figure 23A**) (Wilent and Contreras, 2004; Constantinople and Bruno, 2013).

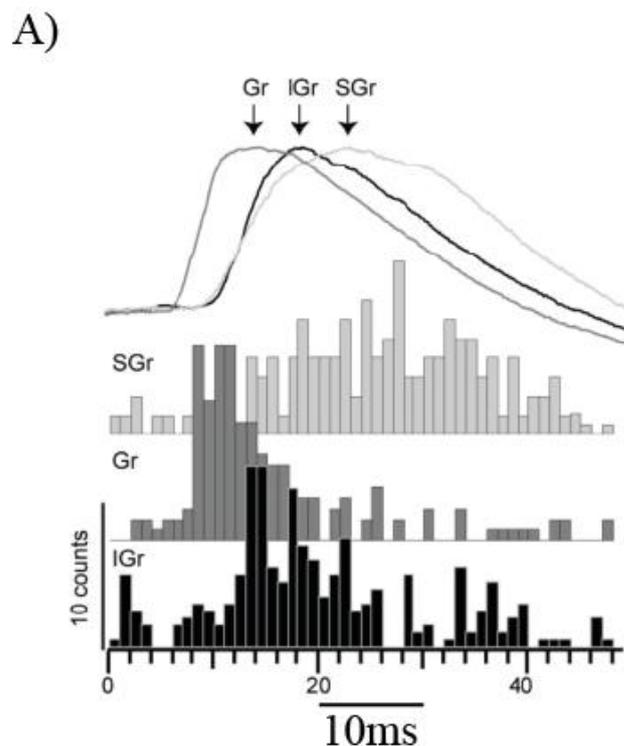


Figure 23 : latences des réponses sensorielles des neurones corticaux des différentes couches. Tirés de [Wilent& Contreras, 2004].

A) Enregistrements intracellulaires de trois neurones des couches supragranulaires (SGr), granulaires (Gr) et infragranulaires (IGr) en réponse à une stimulation transitoire de la vibrisse principale. En haut, réponses synaptiques (amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs) alignées sur le début de la stimulation pour chacun des trois neurones. En bas, PSTH des réponses supralimaires (nombre de potentiels d'action) pour les trois neurones, aligné sur le début (0 ms) de la stimulation. Les pics des réponses sous-limaires et supralimaires sont atteints de manière séquentielle selon l'enchaînement suivant : Gr-IGr-SGr, indiquant que les couches supragranulaires sont activées après les couches infragranulaires.

Ces données laissent penser que les neurones de la couche 5 (et 6) pourraient intégrer des informations sensorielles en provenance de deux voies : une voie thalamo-corticale directe (VPM-L5) et une voie canonique indirecte (VPM-L4-L2/3-L5). Pour vérifier cette hypothèse, une stratégie envisageable serait d'enregistrer les réponses sensorielles des neurones de la couche 5, alors que la voie canonique en amont est spécifiquement mise sous silence. Ceci est rendu possible entre autre par l'utilisation d'agents pharmacologiques qui inhibent ou lèsent les aires corticales d'intérêt. Par exemple en procédant à des lésions excitotoxiques par injection de NMDA au niveau des couches 2/3 du cortex somesthésique du rongeur, il a été proposé que les réponses sensorielles aux stimulations de la vibrisse principale dans les couches granulaires et infragranulaires n'étaient que très peu affectées par l'inactivation des couches superficielles (Huang et al., 1998). Ces auteurs suggèrent toutefois que ces lésions entraînent une réduction partielle de l'amplitude des réponses évoquées par la stimulation de la vibrisse principale. Cette étude est l'une des premières qui tente de démontrer chez le rongeur l'existence de circuits sensoriels parallèles au circuit canonique décrits par Gilbert & Wiesel. Malgré tout, il restait à expliquer par quelle(s) voie(s) sensorielles les neurones des couches profondes reçoivent leurs informations en provenance de la vibrisse principale. Si l'axone collatéral en provenance du VPM qui projette dans la couche 5 permet de poser l'hypothèse forte d'une voie sensorielle directe VPM-L5, rien n'indique qu'il existe des connexions synaptiques fonctionnelles. C'est dans ce contexte que Constantinople & Bruno ont réalisé des enregistrements simultanés des réponses sensorielles dans le VPM (juxtacellulaire) et dans la couche 5 du cortex somesthésique primaire (intracellulaire) chez le rongeur anesthésié (**Figure 24A**). Ils ont pour la première fois enregistré et quantifié des connexions monosynaptiques entre des neurones thalamo-corticaux somatotopiquement alignés avec des neurones des couches 5 ou 6 (**Figure 24B**). Au niveau des neurones de la couche 5, les potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués par le potentiel d'action d'un neurone thalamique sont en moyenne de 500 μ V d'amplitude (**Figure 24C**), ce qui est similaire à ce qui a été observé au niveau des neurones de la couche 4 (Bruno and Sakmann, 2006).

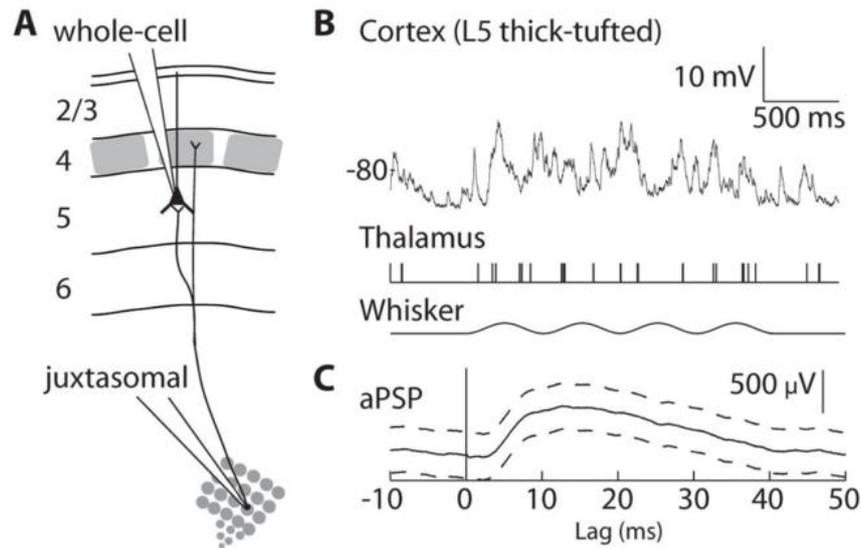


Figure 24 : Les connexions monosynaptiques VPM-L5 sensorielles sont fonctionnelles. Adapté de [Constantinople & Bruno, 2013]

A) Schéma de la procédure expérimentale. Des enregistrements en paires des neurones thalamo-corticaux et des neurones de la couche 5 connectés de manière monosynaptique sont réalisés chez l'animal anesthésié.

B) Exemple des traces d'enregistrements intracellulaires d'un neurone de la couche 5 (en haut), train de potentiels d'actions d'un neurone thalamo-cortical (au milieu) et forme de la stimulation sensorielle (en bas).

C) Potentiel post-synaptiques excitateurs moyens d'un neurone de la couche 5 évoqué par un unique potentiel d'action d'un neurone thalamique (Les lignes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95%).

Ces auteurs ont par ailleurs évalué l'impact de l'inhibition pharmacologique des neurones de la couche 4 ou des couches 2/3, sur les réponses sensorielles des neurones des couches infragranulaires (5 et 6). En injectant de la lidocaïne dans la couche 4 (**Figure 25A**) (bloque les canaux sodiques et donc empêche l'émission de potentiels d'action dans la couche 4, **Figure 25B-D**), les auteurs n'ont observé aucune différence significative dans l'amplitude et la latence des potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués par la stimulation sensorielle dans les neurones de la couche 5 (**Figure 25E-H**) (Constantinople and Bruno, 2013). Ces résultats suggèrent i) que les neurones de la couche 5 sont activés directement par les neurones thalamo-corticaux en réponse à la stimulation transitoire de la vibrisse principale et ii) que la circuiterie canonique passant par la projection L2/3-L5 ne semble pas participer au transfert des informations sensorielles vers la couche 5 (**Figure 26**).

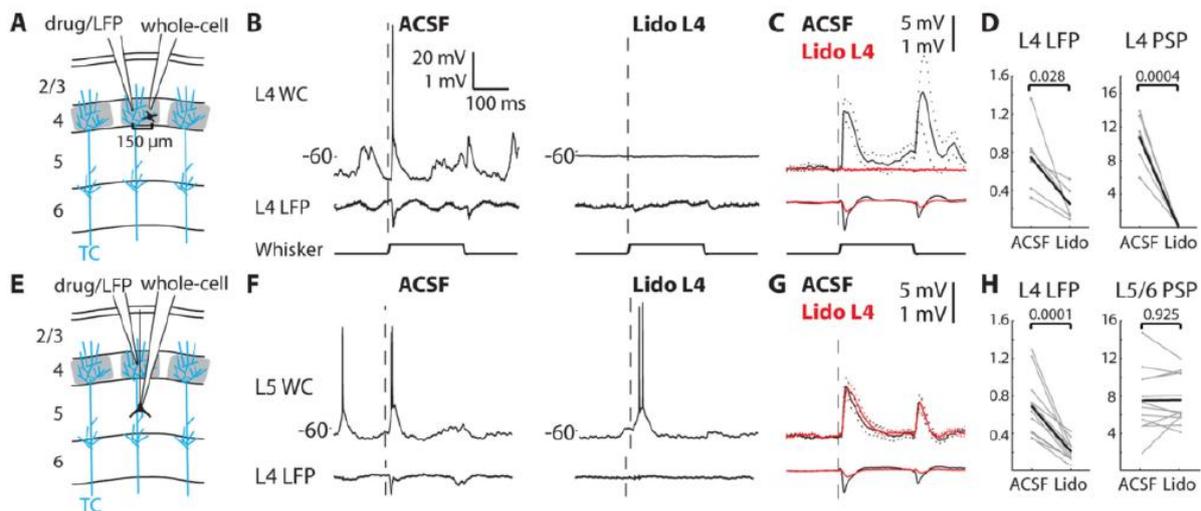


Figure 25 : L'inactivation pharmacologique de la couche 4 n'entraîne pas de modifications des réponses sensorielles dans la couche 5. Tiré de [Constantinople & Bruno, 2013].

A) Schéma du protocole expérimental. Des enregistrements intracellulaires en configuration cellule entière sont réalisés dans la couche 4 chez le rat anesthésié, pendant l'inactivation pharmacologique avec de la lidocaïne (Lido).

B) Enregistrements simultanés intracellulaires et des potentiels de champs (LFP) en condition contrôle (ACSF) et en condition test (Lido). La ligne verticale pointillée indique le début de la déflexion transitoire de la vibrisse principale.

C) Moyenne populationnelle de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (en haut) et des LFP (en bas) pour la condition contrôle (en noir) et la condition test (en rouge) avec les SEM en pointillés.

D) Résumés des réponses sensorielles dans les deux conditions, à l'échelle du LFP (à gauche) et du potentiel membranaire (à droite). La lidocaïne abolit de manière significative les réponses sensorielles synaptiques, et réduit fortement les réponses à l'échelle du LFP.

E-H) Idem que A-D), à ceci près que les enregistrements intracellulaires sont effectués dans la couche 5 (LFP et injection de Lido dans la couche 4). La lidocaïne injectée dans la couche 4 n'induit pas de modification significative de l'amplitude des potentiels post-synaptiques évoqués par la stimulation sensorielle dans les neurones de la couche 5.

Quel serait le rôle de la connexion L2/3-L5 qui semble être « ubiquitaire » puisqu'elle est retrouvée dans plusieurs aires corticales de différents organismes ? Cette projection thalamique directe dans les couches infragranulaires laisse penser que deux circuiteries corticales distinctes intègrent en parallèle les informations sensorielles ascendantes. Ceci pourrait éventuellement permettre à ces deux voies parallèles d'avoir accès aux mêmes informations et d'altérer différemment le comportement de l'animal en agissant via des projections anatomiques radicalement distinctes : les couches 2/3 qui forment majoritairement des projections intracorticales à la fois locales et de longues distances et peuvent avoir un rôle associatif ; tandis que les couches 5 et 6 projettent vers structures sous-corticales et font office à la fois de projection de rétrocontrôle (« feedback ») pour certaines zones cibles (VPM, POM ou encore le tronc cérébral), mais sont également directement liées à « l'action » en se connectant au striatum ou encore la moelle épinière.

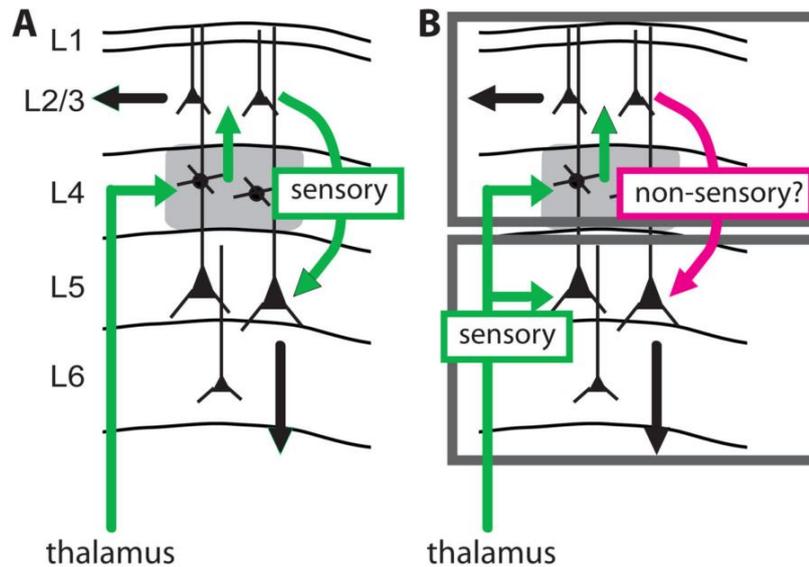


Figure 26 : Représentation schématique du model canonique et du modèle proposé par Constantinople & Bruno. Tiré de [Constantinople & Bruno, 2013].

A) Le modèle sériel du traitement de l'information sensorielle suggère que les informations sont relayées par le thalamus vers la couche 4, sont transmises aux couches 2/3 puis aux couches 5 et 6 (en vert).

B) Les résultats de Constantinople & Bruno semblent indiquer l'existence de deux voies parallèles de traitement de l'information sensorielle. Une copie de ces informations est envoyée directement depuis le thalamus vers la couche 5 du cortex somesthésique. Ce modèle bistratifié suggère que les deux copies de l'information sensorielle sont traitées différemment par ces deux voies et relayées vers différentes structures en aval. La question majeure reste de déterminer le rôle de la connexion L2/3-L5 dans le traitement sensoriel ou bien dans la dynamique des réseaux corticaux (en violet).

Si le travail élégant de Constantinople et Bruno démontre bien qu'il existe un traitement direct des informations sensorielles en provenance du thalamus par les neurones des couches profondes, l'hypothèse d'une déconnexion de la voie entre les neurones des couches 2/3 et les neurones de la couche 5 pendant le traitement sensoriel reste à confirmer.

En effet, les auteurs ont procédé à des enregistrements chez l'animal anesthésié. Une dépression de la synapse induite par l'anesthésie est une des explications possibles à l'absence d'effets de l'inactivation pharmacologique de la voie canonique sur les réponses sensorielles de la couche 5. Si la synapse L2/3-L5 est déjà déprimée par l'anesthésie, l'inhibition n'aura strictement aucun effet.

Il est également possible d'envisager que la communication L2/3-L5 soit recrutée dans des conditions de stimulations différentes de celles utilisées dans l'étude conduite par Constantinople & Bruno. Les stimuli de type rampe-et-maintien utilisés sont peut-être trop faibles en terme de vitesses pour activer les neurones des couches 2/3, et l'utilisation de stimuli plus fortes vitesses et soutenus pourraient être nécessaire au recrutement de la

connexion L2/3-L5.

D'autre part, l'utilisation des méthodes d'inactivations pharmacologiques ne permettent pas de cibler un type cellulaire spécifique. Il est possible que l'application de lidocaïne ait conduit à l'inactivation de plusieurs circuits corticaux aux effets opposés.

Dans ce contexte que j'ai implémenté une technique de manipulation optogénétique de l'activité des neurones pyramidaux des couches 2/3 chez la souris éveillée pour pouvoir évaluer leur impact sur les propriétés des réponses sensorielles des neurones des couches infragranulaires lors de stimulations des vibrisses mimant leur comportement vibratile observé lors de tâches de discrimination de texture.

En effet, les manipulations optogénétiques offrent la possibilité d'identifier et de manipuler des connexions synaptiques spécifiques d'une sous-population de neurones définie sur la base de leur profil d'expression génique, de la position de leur corps cellulaire au sein d'une colonne ou encore de l'aire corticale d'origine (Lima et al., 2009).

C. Dissection optogénétique du rôle de la connectivité corticale dans le traitement sensoriel.

La manipulation optogénétique du patron d'activité des neurones est une technique dont l'utilisation a été décuplée ces dix dernières années. Sommairement, elle consiste à exprimer à la surface des neurones une protéine sensible à la lumière. Une fois excitée cette protéine peut, selon ses propriétés biophysiques, laisser passer différents ions de part et d'autre de la membrane des neurones. Ce qui a pour conséquence de les dépolariser ou de les hyperpolariser, offrant ainsi l'opportunité d'en contrôler leur activité. En la combinant à diverses méthodes de construction géniques, ou à divers outils viraux, il est possible de faire exprimer ces protéines dans des sous-populations de neurones et des aires cérébrales spécifiques. Cet outil permet ainsi d'adresser des questions fondamentales en neuroscience allant de l'étude de la connectivité neuronale fonctionnelle à l'impact physiologique de l'activation/inactivation d'une sous population de neurones sur le comportement. L'objectif de ce chapitre est de passer en revue le principe de fonctionnement général des approches optogénétiques et d'illustrer à travers quelques exemples leur apport à la compréhension du rôle de la connectivité cortical dans le traitement sensoriel.

1. Les opsines : protéines activables par la lumière

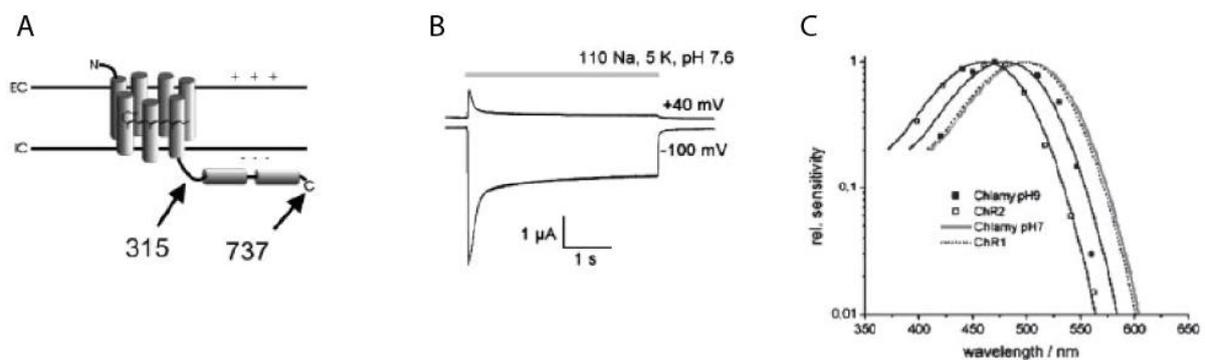
Il est possible de distinguer deux grands groupes de protéines : les protéines retrouvées chez certains êtres unicellulaires (de type 1) également appelé opsine « microbiennes » et les protéines retrouvées chez les mammifères (de type 2). La différence fondamentale entre ces deux groupes réside dans leur façon d'influencer les courants ioniques transmembranaires. Les protéines de type 2 agissent de manière indirecte sur la membrane cellulaire, ce sont des récepteurs couplés à des protéines G dont l'activation induit une cascade de signalisation intracellulaire. Au contraire, les protéines de type 1 (trouvées chez les archaebactéries, les eubactéries, les « champignons » ou encore les algues vertes unicellulaires) agissent de manière directe sur les courants transmembranaires (protéines de type canal ou pompe).

Trois protéines sensibles à la lumière qui ont été majoritairement utilisées pour disséquer le rôle de la connectivité corticale dans le traitement sensoriel : la channelrhodopsine-2 (ChR2), la halorhodopsines (HR) et enfin l'archeorhodopsine de type 3 (Arch-3) (pour revue : (Yizhar et al., 2011)). Ces 3 opsines diffèrent les une des autres par leurs propriétés biophysiques, telles que leurs cinétiques d'activation/dé-activation, leur

sélectivité ionique, leur longueur d'onde d'excitation ou encore l'amplitude des courants résultants de leur activation.

2. La Channelrhodopsine-2 (ChR2)

Deuxième protéine de la classe des channelrhodopsines à avoir été identifiée (ChR1 étant la première (Nagel et al., 2002)), cette opsine est sans doute la plus largement utilisée en neurosciences. La ChR2 est une protéine microbienne (**Figure 27A**) extraite de l'algue verte *Chlamidomonas Reinhardtii* (Nagel et al., 2003). Lorsqu'elle est exprimée à la surface d'un ovocyte de xénope, ou de cellules mammifères, l'activation de la ChR2 par photo-stimulation induit une entrée d'ions cationiques non spécifique (Nagel et al., 2003). Lors d'une stimulation lumineuse soutenue, ce courant est caractérisé par une inactivation plus ou moins importante (**Figure 27B**).



Adapté de Nagel et al., 2003

Figure 27 : Structure et propriétés de la ChR2. Adapté de [Nagel et al., 2003]

A) Schéma de la structure prédite de la ChR2, avec les 7 domaines transmembranaires caractéristiques des opsines.
 B) Enregistrement en configuration voltage-clamp d'un ovocyte exprimant la ChR2, dans une solution de Ringer dont les concentrations ioniques du sodium et du potassium sont indiquées. La photo-stimulation à 470 nm est indiquée par la barre horizontale grise. Deux potentiels de maintien (+40 mV et -100 mV) sont utilisés pour montrer l'effet net de la photo-stimulation, qui se traduit par un courant entrant cationique (à -100 mV, réversé à +40 mV et donc sortant).
 C) Spectre d'activation de la ChR2 à pH 7.6 et -100 mV (potentiel de maintien) symbolisé par les carrés vides, l'amplitude des photo-courants est normalisée.

L'étude de la structure cristallographique de la ChR2 a révélé la présence de 7 domaines transmembranaires interconnectés par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Ces domaines transmembranaires forment un pore électronégatif conférant à cette protéine une sélectivité ionique en faveur des cations (Prigge et al., 2012). Cette protéine contient un chromophore, le rétinal qui forme une liaison covalente avec une Lysine 296 (257) sur le 7^e domaine transmembranaire pour former une base de Schiff. L'environnement

protéique autour du chromophore est tel que le domaine d'absorption maximal de la lumière par la ChR2 est de 470 nm (lumière bleue) (**figure 27C**) (Nagel et al., 2003; Prigge et al., 2012).

En raison de ces cinétiques rapides d'activation et de dé-activation (Tableau 2), si elle est exprimée dans un neurone, l'activation de la ChR2 peut évoquer des potentiels d'action de manière réversible et temporellement fiable *in vitro* ou *in vivo* (**Figure 28A-C**) (Boyden et al., 2005; Cardin et al., 2009).

Cinétiques de la ChR2(Boyden et al., 2005; Mattis et al., 2012) :

Temps au pic	Fermeture τ_{off}	Désensibilisation τ_{des}	Récupération 50% / 100%
8-10 ms	11 ms	25-30 ms	3 s / 30 s

Tableau 2 : les principales propriétés biophysiques de la ChR2

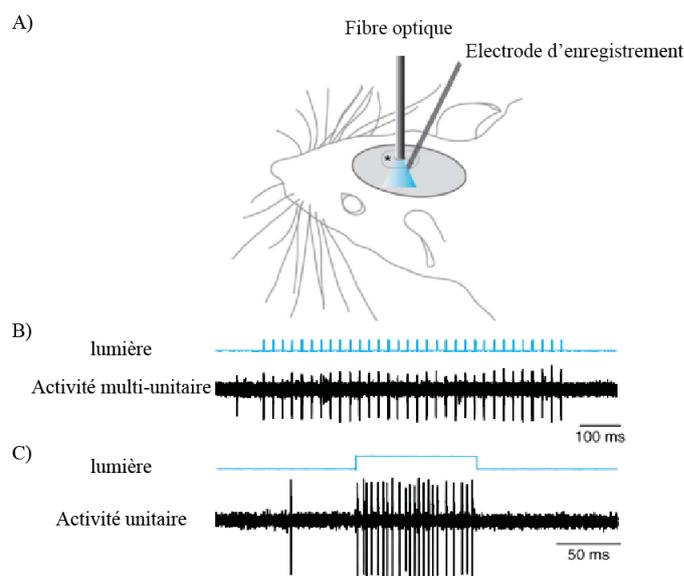


Figure 28 : Activité neuronale évoquée par la photo-stimulation de la ChR2, exprimée spécifiquement dans les interneurons à PV. Adapté de [Cardin et al., 2010]

A) Schéma du protocole d'enregistrement et de stimulation chez la souris anesthésiée.

B) Enregistrements extracellulaires multi-unitaires des réponses à la photo-stimulation de la ChR2, qui consiste en des créneaux de lumière d'une durée de 1 ms répétés à 50 Hz. La population de neurones répond de manière fiable et temporellement précise à la stimulation à haute fréquence.

C) Enregistrement extracellulaire unitaire d'une réponse à un créneau de lumière continu durant 100 ms (interneurone PV exprimant la ChR2).

3. Les opsines inhibitrices : halorhodopsine et archéorhodopsine

En neuroscience, et plus particulièrement en neurophysiologie de la perception, un très grand nombre d'études ont utilisé des approches de lésions ou d'inhibition pharmacologiques pour révéler les fonctions d'une aire corticale ou d'un réseau de neurones. Ces approches n'offrant pas la possibilité d'être spécifique et réversible, l'utilisation d'opsines permettant de photo-inhiber des neurones cibles représente un enjeu majeur pour comprendre le fonctionnement cérébral. Il existe deux grandes classes d'opsines inhibitrices : la classe des Halorhodopsines (HR), qui sont des pompes à chlore activables par la lumière (590 nm) transportant de manière sélective les ions chlorures (du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire) ; et la classe des Archeorhodopsines (Arch) également une pompe à proton photo-activable (530 nm) (laissant passer les protons H^+ du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire).

C'est pour la première fois en 2007 qu'une opsine HR a été utilisée pour inactiver des neurones : l'opsine nommée NpHR, découverte chez une bactérie de la famille des halobactéries *Natronomonas Pharaonis* (Lanyi and Oesterhelt, 1982; Han and Boyden, 2007). La photo-inhibition des neurones par l'halorhodopsine peut permettre de procéder à des manipulations comportementales, comme cela a été montré chez le rongeur par l'équipe de Deisseroth en 2010 (Witten et al., 2010). L'halorhodopsine présente cependant le désavantage de s'inactiver relativement rapidement et les courants évoqués sont plutôt faibles.

Cette limitation peut être palliée par l'utilisation de l'autre classe d'opsine, les archeorhodopsines et plus particulièrement l'archeorhodopsine-3 (Arch-3). Cette pompe à protons dont le gène est extrait de l'haloarchaebactérie *Halorubrum Sodomense* permet d'inhiber quasiment à 100% l'activité des neurones du cortex visuel primaire de la souris qui l'expriment à leur membrane (**Figure 29**) (Chow et al., 2010). L'Arch-3 s'inactive peu en comparaison à la NpHR et présente une désensibilisation plus faible.

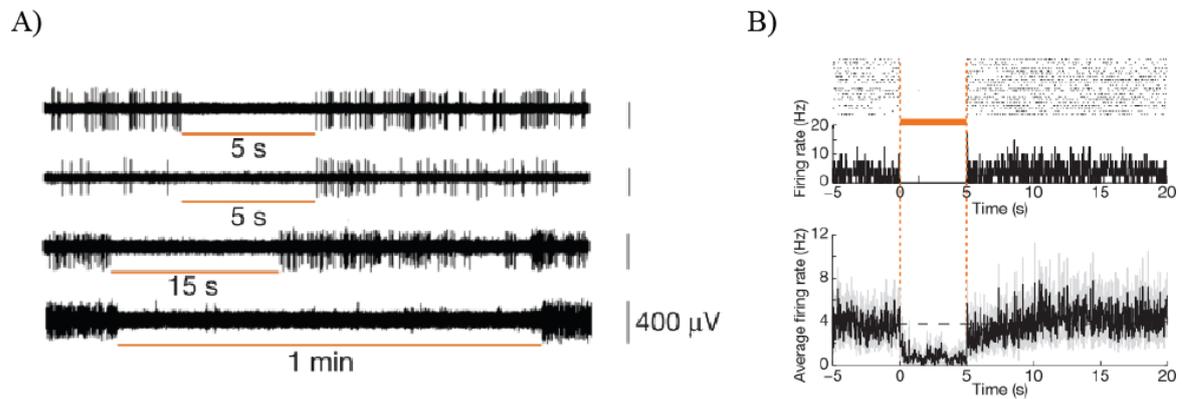


Figure 29 : Effet de la photo-stimulation d'un neurone exprimant l'Arch-3. Adapté de [Chow et al., 2010]

A) Enregistrement extracellulaire d'un neurone exprimant l'Archeorhodopsine-3 (Arch-3), dans différents protocoles de photo-stimulation à 593 nm : 5 s, 15 s et 1 min d'activation de l'Arch-3 de manière continue. L'activité supraliminaire du neurone peut être inhibée à hauteur de 100%, et perdure tout au long de la photo-stimulation sur plusieurs secondes.

B) Activité d'un neurone exprimant l'Arch-3 avant, pendant (entre les lignes pointillées orange) et après la photo-stimulation. En haut, raster plot (chaque point est un PA, chaque ligne est un essai) et PSTH représentant fréquence instantanée moyennée sur les différents essais du neurone au cours des différentes périodes de stimulation. En bas, moyenne populationnelle de 13 unités photo-stimulée à 593 nm dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

4. Différentes stratégies d'expression des opsines

Après avoir sélectionné l'opsine en fonction du type de manipulation souhaité se pose la question de la stratégie à employer pour l'exprimer spécifiquement dans un type de neurones cibles.

4.1. Les vecteurs viraux

Le lentivirus est l'un des vecteurs viraux les plus utilisés. Sa faible toxicité lui permet d'être utilisé dans le cadre de thérapies géniques chez l'Homme, et bien sûr dans le cadre de manipulation génétique chez l'animal. Le lentivirus peut infecter des cellules en division ou non (donc peut infecter les neurones), et est utilisable chez l'adulte. L'expression du transgène est stable au cours du temps. Le matériel génétique véhiculé par le virus est généralement une séquence d'ADN contenant le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur fort et/ou spécifique d'un sous type de neurones (par exemple $CamKII\alpha$, spécifique des neurones excitateurs au niveau du cortex).

L'avantage d'un tel virus est qu'il permet une expression génique avec une bonne résolution spatiale, puisque le site d'expression dépend du site d'injection (et que le mode d'infection du virus n'est pas trans-synaptique). En revanche, le virus possède un certain tropisme pour les neurones excitateurs et donc ne semble pas être approprié pour transfecter

les interneurons (Nathanson et al., 2009). De plus son volume de diffusion est relativement faible, il nécessite plusieurs sites d'injection pour infecter une large zone comme le cortex à tonneaux par exemple.

D'autres types de virus peuvent être utilisés dans le but d'exprimer une opsine dans les neurones d'un certain type. Le virus de type Adeno-Associé (Adeno-Associated Virus, AAV) est plus petit que le lentivirus et de ce fait diffuse plus largement dans le tissu cérébral que ces derniers. Les AAV peuvent infecter des neurones excitateurs ou inhibiteurs (contrairement aux lentivirus), et il en existe plusieurs sérotypes (qui ne seront pas détaillés) dont le tropisme d'infection cellulaire est différent. Les AAV peuvent être antérogrades, rétrogrades ou trans-synaptiques (infecter plusieurs neurones en traversant les synapses) et plus sensibles aux interneurons ou aux neurones pyramidaux.

Deux principales stratégies reposant sur l'utilisation des AAV permettent l'expression du gène de la ChR2 (ou d'une autre opsine) spécifiquement dans certaines populations neuronales. La première consiste à insérer, comme pour les lentivirus, le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur spécifique : par exemple le promoteur de la Parvalbumine pour une expression spécifique dans les interneurons PV (Cardin et al., 2009). Une autre stratégie repose sur une construction virale dans laquelle l'expression du gène de la ChR2 est constitutivement inhibée par une séquence d'ADN située en amont, la séquence « STOP » flanquée de deux sites LoxP (LoxP-STOP-LoxP). Ces sites LoxP sont la cible d'une enzyme particulière, la Cre-recombinase, qui excise la séquence d'ADN située entre les deux sites LoxP. Ainsi, l'expression de la ChR2 n'est donc possible que si la séquence « STOP » est excisée (délétion) par la présence de la Cre-recombinase. Cette protéine peut être exprimée spécifiquement dans des populations neuronales de certaines structures cérébrales de souris génétiquement modifiées.

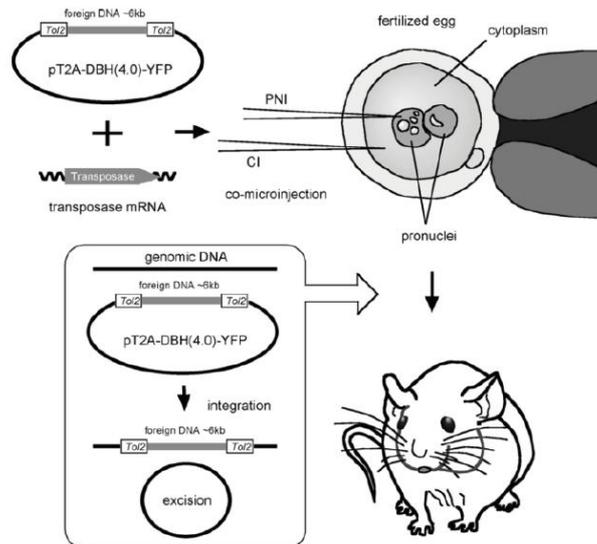


Figure 30 : Représentation schématique de la technique de transgénèse reposant sur les chromosomes bactériens artificiels. Tiré de [Sumiyama et al., 2010].

PNI : injection pronucléaire ; CI : injection cytoplasmique

Pour générer ces souris, l'approche consiste à introduire des chromosomes bactériens artificiels (ou BAC pour « Bacterial Artificial Chromosome ») dans la cellule œuf fertilisée de la souris. Ce matériel BAC contient la séquence d'ADN à intégrer au génome de la souris (celui de la Cre-recombinase) sous le contrôle d'un promoteur et flanquée (en amont et en aval) de deux séquences d'ADN transposables (le transposon Tol2). La micro-injection du BAC dans le pronucleus (mâle) de la cellule œuf est accompagnée de celle de l'ARN messager qui code pour une protéine particulière : la transposase. Cette protéine pourra exciser le fragment d'ADN au niveau des transposons qui sera par la suite intégré de manière aléatoire dans le génome de la souris (**Figure 30**) (Sumiyama et al., 2010). Il existe une banque de lignées de souris transgéniques qui les répertorie selon le profil spatio-temporel de l'expression de la Cre-recombinase : le projet GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas ; Gong et al., 2003). Plusieurs lignées de souris exprimant le gène de la Cre-recombinase (voir ci-dessous) dans des sous-populations neuronales spécifiques ont ainsi été générées dans le cadre du projet GENSAT, ce qui permet de combiner la stratégie BAC à l'utilisation de vecteurs viraux AAV exprimant le gène de l'opsine.

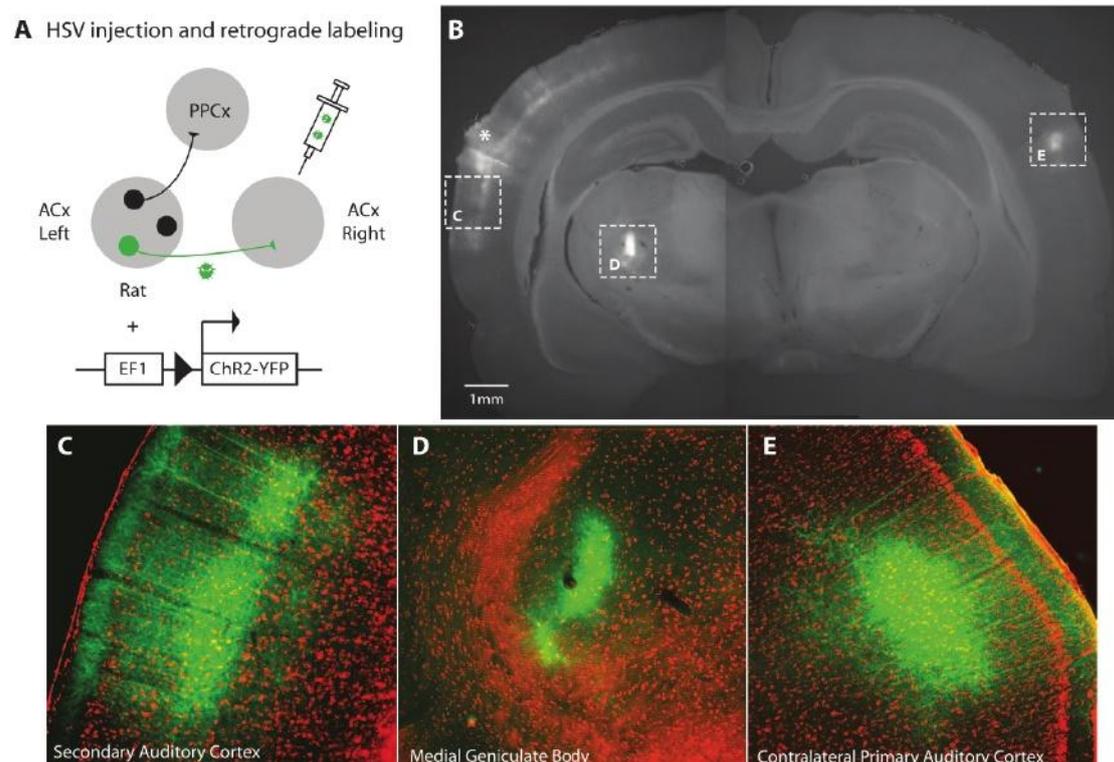


Figure 31 : Expression spécifique de la ChR2-YFP dans les neurones qui projettent vers le cortex auditif droit de la souris, via l'injection des virus rétrogrades de type HSV. Tiré de [Lima et al., 2009].

A) Schéma du protocole expérimental : le virus Herpes Simplex (HSV1) exprimant le gène ChR2-YFP sous le contrôle d'un promoteur fort (EF1) est injecté dans le cortex auditif droit du rat. Le virus infecte de manière rétrograde les neurones qui projettent vers ce site d'injection.

B) Section coronale du cerveau du rat 10 jours après avoir réalisé le protocole décrit en A. Le site d'injection est symbolisé par l'astérisque à gauche. Les différents carrés pointillés délimitent les zones de marquages obtenus après l'infection rétrograde du virus HSV1 (voir C-E).

C) Co-marquage vert (ChR2-YFP) et rouge (Nissl) dans le cortex auditif secondaire, permettant de visualiser tous les neurones (marquage de Nissl) et plus particulièrement ceux exprimant ChR2-YFP.

D) Comme en C., pour le corps géniculé médial (noyau thalamique auditif)

E) Comme en C. et D. pour le cortex auditif primaire controlatéral.

Enfin, un autre type de virus peut être utilisé avec les mêmes stratégies développées ci-dessus : l'herpes (Herpes Simplex Virus 1, HSV1). Ce type de virus présente la particularité d'infecter les terminaisons axonales et de voyager de manière rétrograde le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire. Ainsi l'expression de la ChR2 peut cette fois être spécifique d'une population de neurones basée non pas sur leur profil d'expression génique, mais sur leur zone de projection. Tous les neurones qui sont modulés par la photo-stimulation projettent vers la zone d'injection du virus rétrograde (**Figure 31**) (Lima et al., 2009).

L'inconvénient majeur de l'utilisation du virus HSV1 est l'importante toxicité cellulaire dont il peut faire preuve, pouvant entraîner d'importantes morts neuronales.

4.2. L'injection de plasmides par électroporation *in utero*

Cette technique consiste en une micro-injection de plasmides contenant les séquences d'intérêt dans le ventricule cérébral de souris aux stades embryonnaires. Ces plasmides sont transfectés dans les cellules adjacentes au ventricule grâce à un courant électrique circulant entre deux électrodes situées de part et d'autre de l'embryon. Selon le stade embryonnaire, les progéniteurs neuronaux présents à l'aplomb du ventricule donnent naissance aux neurones glutamatergiques d'une couche corticale spécifique par migration le long de la glie radiaire au cours du développement. Le stade embryonnaire auquel est effectuée l'électroporation détermine donc la couche corticale qui sera transfectée. Lorsque cette approche est utilisée à E15 chez la souris, elle permet théoriquement de transfecter spécifiquement les neurones glutamatergiques des couches superficielles du cortex.

Suivant l'orientation de l'anode et de la cathode utilisées pour appliquer les créneaux de courant, il est possible de viser une aire corticale comme le cortex somatosensoriel primaire. L'électroporation est unidirectionnelle, si bien que seule la partie des ventricules latéraux la plus proche de l'anode sera transfectée par électroporation (**Figure 32B**) (pour revue : (Saito, 2006)).

L'utilisation de l'électroporation *in utero* s'avère être une stratégie de premier choix pour exprimer une opsine (ChR2, Arch, etc.) de manière spécifique dans les neurones excitateurs des couches 2/3, et pouvoir ainsi les manipuler de manière fiable et précise (Petreanu et al., 2007).

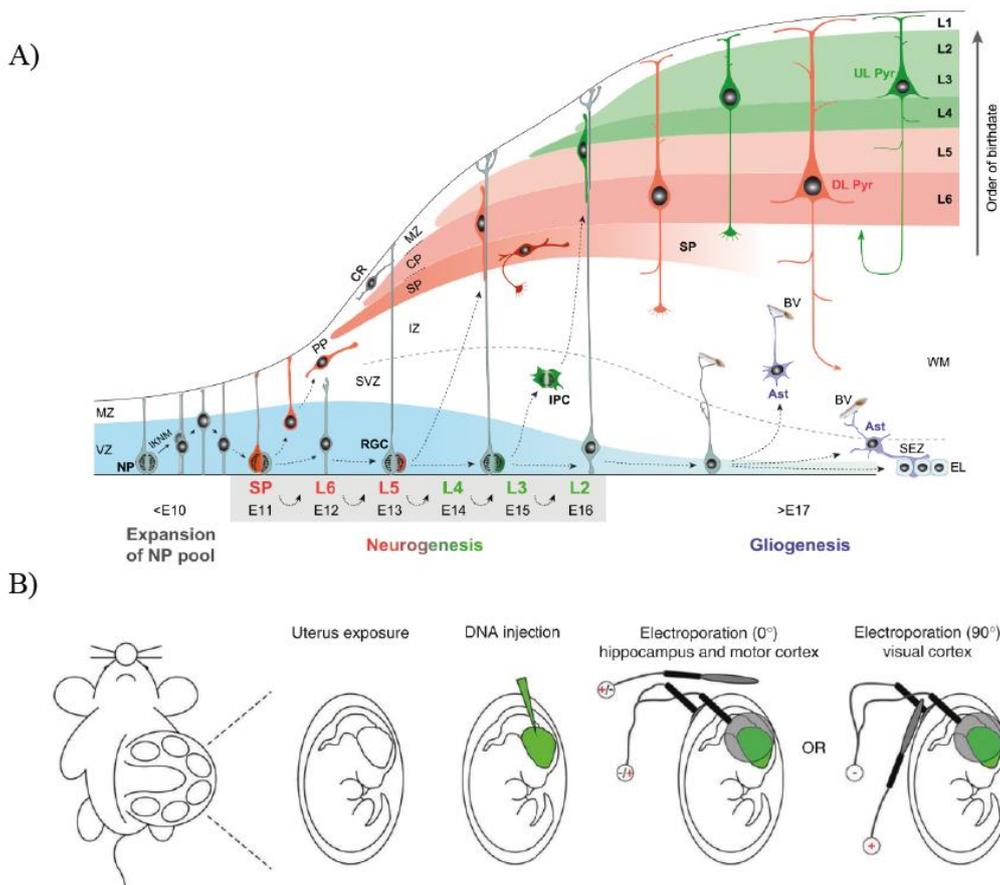


Figure 32 : Principe général de l'électroporation in utero. Tiré de (A) [Kwan et al., 2012] et (B) [Dal Mashio et al., 2012].

A) Schéma de la migration des neurones corticaux au cours du développement embryonnaire. Avant le début de la neurogénèse, les progéniteurs neuraux (NPs) de la zone ventriculaire (VS, bleu) se divisent de manière symétrique pour agrandir le nombre de progéniteurs. À partir du 11^e jour du développement embryonnaire (E11), les NPs commencent à se diviser de manière asymétrique pour générer des neurones, qui migrent de la VZ via les cellules de la glie radiaire (RGC) pour atteindre les différentes couches du cortex en développement. Au cours de la neurogénèse, divers sous-types de neurones sont générés de manière séquentielle via les divisions asymétriques des NPs. Les neurones des couches 6 puis 5 sont les premiers à migrer à partir de E12, puis les neurones de la couche 4 (E14) et enfin des couches 3 et 2 (E15/E16). Certaines cellules filles des NPs migrent vers la zone sous ventriculaire (SVZ) puis s'y divisent de manière symétrique pour former des cellules progéniteurs intermédiaires (IPCs). Ce mode de neurogénèse contribue significativement à la formation des couches superficielles. BV : vaisseau sanguin ; CR : neurone Cajal-Retzius ; DL Pyr : neurone pyramidal des couches profondes ; UL Pyr : neurone pyramidal des couches superficielles ; WM : substance blanche

B) Schéma du protocole expérimental d'injection d'ADN par électroporation in utero. L'ADN est micro-injecté dans les ventricules latéraux puis les électrodes (deux ou trois suivant les structures visées) sont placées et orientées de telle manière que seuls les progéniteurs neuronaux qui donneront les neurones migrant vers la structure d'intérêt sont électroporés et incorporent l'ADN. En fonction du stade embryonnaire auquel est réalisé l'électroporation (voir A.), il est possible de cibler l'une des 6 couches du cortex.

5. Considérations techniques en lien avec l'outil optogénétique

Est-ce que l'expression de protéines exogènes à la surface membranaire des neurones, pouvant induire des courants entrants ou sortants de cations ou d'anions, modifie le fonctionnement normal des neurones qui l'expriment ?

Cette question est primordiale et doit être explorée avant toutes utilisations de l'optogénétique. Puisqu'un nombre conséquent de protéines exogènes se retrouvent logées à la membrane plasmique, il est envisageable que cela affecte la morphologie globale des neurones qui l'expriment. Une étude a montré qu'une expression à long terme de la ChR2 (chez le rat, supérieur à 40 jours) modifie la morphologie des axones exprimant l'opsine, et conduit à des synapses surnuméraires, anormalement larges et ectopiques (Miyashita et al., 2013). Ce résultat reste débattu parce que les auteurs ont utilisé une ChR2 « humanisée » (ChR2-H134R), différente de la ChR2 classiquement utilisée. Les propriétés intrinsèques des neurones exprimant la ChR2 ne semblent pas être modifiées par la simple présence de ces canaux (Kravitz et al., 2010). Une autre considération importante porte sur les modifications potentiellement inductibles non pas par la simple présence des canaux, mais par leur activité biophysique. Une activation prolongée d'une opsine excitatrice (courants sodiques, calciques) ou inhibitrice (chlorures, protons) peut modifier les concentrations ioniques extracellulaires, ce qui peut altérer l'activité des neurones locaux qui n'expriment pas l'opsine à leur membrane (Ferenczi and Deisseroth, 2012). Par ailleurs, la photo-stimulation de la ChR2 évoque de larges courants calciques entrants et peut donc induire des phénomènes de plasticité au sein du réseau de neurones stimulés (Schoenenberger et al., 2011).

L'un des moyens les plus simples et employés pour stimuler la ChR2 (par exemple) passe par l'utilisation de fibres optiques (LED) dont l'extrémité peut être plus ou moins fine selon les besoins expérimentaux. La lumière diffuse à partir de cette extrémité sous forme de cône plus ou moins large (dépendant de la largeur de la pointe) et la puissance de la lumière projetée décroît avec l'épaisseur du tissu visé. Chez un animal anesthésié (ou éveillé), ces stimulations peuvent être appliquées à travers la dure-mère en plaçant la fibre optique à l'extérieur du cerveau (au-dessus d'une fenêtre de craniotomie). La fibre optique peut également être implantée dans des structures cérébrales plus ou moins profondes. Lorsqu'utilisée à l'extérieur du cerveau, le faisceau de lumière peut créer d'importants artefacts électriques en illuminant l'électrode d'enregistrement électrophysiologique (métal, tungstène, fil d'argent dans une pipette de verre, etc.). Ces artefacts de stimulations (visibles

essentiellement sur les potentiels de champs locaux) peuvent être différenciés de l'activité neuronale par leurs faibles latences par rapport au créneau de lumière (Cardin et al., 2010). Il est possible de prévenir l'apparition de ces artefacts en minimisant le temps et la surface d'exposition du métal à la photo-stimulation. Enfin, il est primordial d'être très précautionneux sur la puissance lumineuse délivrée au travers de la fibre optique. Il a été reporté qu'une stimulation supérieure à $100 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ sur une période prolongée (>500 ms) peut entraîner d'importants dommages de la partie du cortex exposée aux faisceaux de lumière (Cardin et al., 2010).

La résolution spatiale est extrêmement faible, mais n'est pas une limitation technique majeure lorsqu'il s'agit de manipuler simultanément une large fraction de neurones à l'échelle d'une aire corticale (O'Connor et al., 2013). Il est tout de même possible d'augmenter drastiquement la résolution spatiale des photo-stimulations à l'échelle du neurone ou même de l'épine dendritique à l'aide de lasers, notamment pour construire une carte spatiale de la distribution d'entrées synaptiques (Petreanu et al., 2009; Papagiakoumou et al., 2010; Packer et al., 2012).

6. Quelques exemples d'utilisation d'approches optogénétiques pour disséquer le rôle de la connectivité corticale dans le traitement sensoriel

Les premières utilisations de l'optogénétique ont très vite été orientées vers le rôle fonctionnel des différents sous-types d'interneurones corticaux (Cardin et al., 2009). Déterminer comment les différents interneurones transforment les réponses sensorielles des neurones excitateurs est une question centrale en neurophysiologie. Le rôle de chacun des sous-types d'interneurones dans l'intégration sensorielle est une question rendue abordable grâce à l'expression spécifique de la ChR2 ou encore de l'Halo/Archeorhodopsine dans les différents interneurones corticaux (PV+, SOM+, VIP).

Parce qu'ils projettent vers des territoires neuronaux différents (connexions périsomatiques, dendritiques ou axo-axonales), qu'ils possèdent des profils électrophysiologiques distincts et qu'ils sont inscrits dans des sous-réseaux neuronaux différents, les interneurones corticaux de différents types moléculaires peuvent avoir un rôle spécifique sur la manière dont ils modulent les réponses sensorielles. Les premiers travaux ont cherché à comprendre notamment comment les interneurones à parvalbumine modulent les propriétés intégratives des neurones excitateurs, entre autres parce qu'ils représentent la moitié des interneurones GABAergiques du cortex. En réponse à des stimuli visuels de

différentes orientations, Atallah et collaborateurs ont suggéré que les interneurons à parvalbumine des couches 2/3 ont très peu d'impact sur la sélectivité à l'orientation (et à la direction) des neurones excitateurs (couches 2/3), mais peuvent moduler le gain des réponses sensorielles (Atallah et al., 2012) (**Figure 33**). Les auteurs ont tiré profit de l'utilisation de la ChR2 et de l'Arch (deux conditions expérimentales distinctes) exprimées dans ces interneurons pour manipuler de manière bidirectionnelle leur activité, et en déterminer les effets sur les réponses sensorielles des neurones excitateurs. Alors que la suppression de l'activité des interneurons à parvalbumine (lorsqu'ils expriment l'Arch) entraîne une augmentation des réponses des neurones excitateurs, les photo-stimulations excitatrices de ces interneurons (lorsqu'ils expriment la ChR2) suppriment une partie des réponses sensorielles des neurones excitateurs.

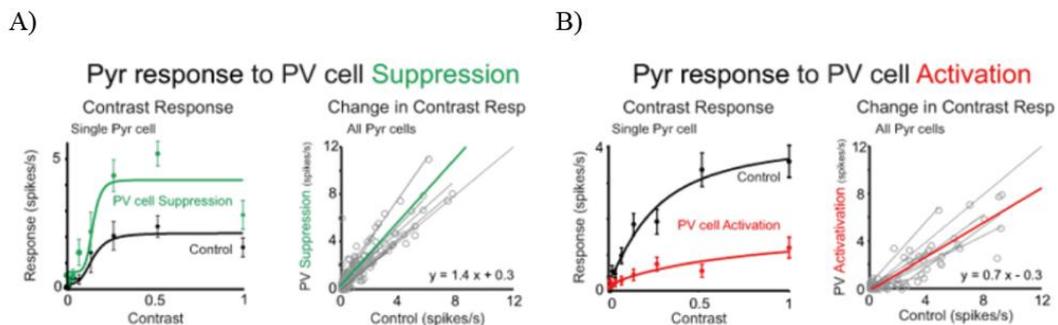


Figure 33 : Effets de la manipulation bidirectionnelle des interneurons PV exprimant soit la ChR2 soit l'Arch, sur les réponses des cellules pyramidales à des stimuli visuels de différents contrastes. Tiré de [Atallah et al., 2012].

A) À gauche, réponses à différents contrastes d'une cellule pyramidale dans une condition contrôle (en noir) ou pendant l'inactivation des interneurons PV exprimant l'Arch (en vert). À droite, en gris : fréquences de décharge de la cellule pyramidale évoquées par les stimuli visuels pendant la suppression de l'activité des interneurons PV, exprimées en fonction de la condition contrôle (chaque cercle est un des 8 contrastes utilisés pour chaque cellule). Les lignes grises sont les fits linéaires de chaque cellule, la ligne verte est la moyenne des fits linéaires en gris. Si la suppression des interneurons PV n'a pas d'effet sur les réponses sensorielles des cellules pyramidales, alors la moyenne des fits linéaires devrait être proche de la première bissectrice de cette représentation graphique. Or l'équation de ce fit linéaire moyen est $y = 1.4x + 0.3$. Le coefficient directeur étant strictement supérieur à 1, le fit linéaire moyen permet de se rendre compte d'un effet multiplicatif sur le gain des réponses sensorielles lorsque les interneurons PV sont inhibés.

B) Comme en A. sauf que les interneurons PV expriment la ChR2 et sont activés par la photo-stimulation (en rouge). À droite, la ligne rouge est la moyenne des fits linéaires en gris. L'effet de l'activation des interneurons PV est inverse à l'effet en A., indiquant un effet de division sur le gain des réponses sensorielles ($y = 0.7x - 0.3$).

L'expression des réponses sensorielles mesurées en fonction de l'intensité du contraste permet d'observer une relation sigmoïdale entre la réponse et le stimulus (**Figure 33A**, relation entrée-sortie à gauche). L'inhibition des interneurons PV (Arch+) entraîne une augmentation de la réponse maximale (au plateau) des neurones pyramidaux, et dans une moindre mesure les réponses sensorielles pour des faibles contrastes. Afin de déterminer la relation entre cette facilitation et l'intensité du stimulus, les auteurs ont exprimé les réponses contrôles à chacun des huit contrastes de tous les neurones pyramidaux enregistrés en fonction

des réponses en condition facilitée (suppression des interneurons PV). S'il n'y avait aucun effet de la photo-stimulation, toutes les réponses (contrôle vs photo-stimulation) seraient distribuées le long de la première bissectrice du graphique (relation linéaire de coefficient directeur égale à 1). La moyenne des régressions linéaires reflète une modulation multiplicative des réponses facilitées, reflétée par un coefficient directeur supérieur à celui de la première bissectrice sans modification significative de l'ordonnée à l'origine (**Figure 33A**, en vert à droite). Cette augmentation de la pente suggère fortement que la suppression des interneurons PV entraîne une modulation multiplicative du gain des réponses sensorielles des neurones pyramidaux. De la même manière, la diminution de la pente des relations linéaires entre les réponses contrôles et les réponses supprimées par la photo-activation des interneurons à PV (ChR2+, **Figure 33B** à gauche) indique une modulation divisive du gain (**Figure 33B**, en rouge à droite).

Ce résultat a été confirmé par une autre étude (Wilson et al., 2012). Par ailleurs, dans le cadre de cette deuxième étude, les auteurs ont également étudié le rôle des neurones exprimant la somatostatine dans la modulation des réponses sensorielles des neurones excitateurs. Ils ont ainsi montré que cette classe d'interneurones module la sélectivité à l'orientation des neurones excitateurs sans modifier le gain de leurs réponses à des stimulations de différents contrastes.

Ceci laisse penser que la connectivité entre les interneurons à parvalbumine et les neurones excitateurs, différente de celle des interneurons à somatostatine, peut expliquer la manière dont les interneurons modulent les réponses sensorielles. Les interneurons à parvalbumine ont tendance à se connecter à des neurones excitateurs qui partagent des sélectivités (à l'orientation) similaires, tandis que les interneurons à somatostatine sont moins spécifiques au regard de la sélectivité sensorielle des neurones pyramidaux (**Figure 34**) (Wilson et al., 2012). Ainsi, l'inhibition par les interneurons à parvalbumine est moins forte pour des orientations non préférentielles et maximum pour l'orientation préférée (commune aux neurones excitateurs cibles). Donc la modulation des réponses sensorielles n'est pas uniforme, quelle que soit la stimulation, caractéristique de la modulation du gain (effet divisif). À l'inverse les interneurons à somatostatine exercent, à l'échelle de la population, une inhibition plus constante sur les neurones excitateurs, quelle que soit la stimulation conduisant à une modulation du seuil des réponses sensorielles (effet soustractif).

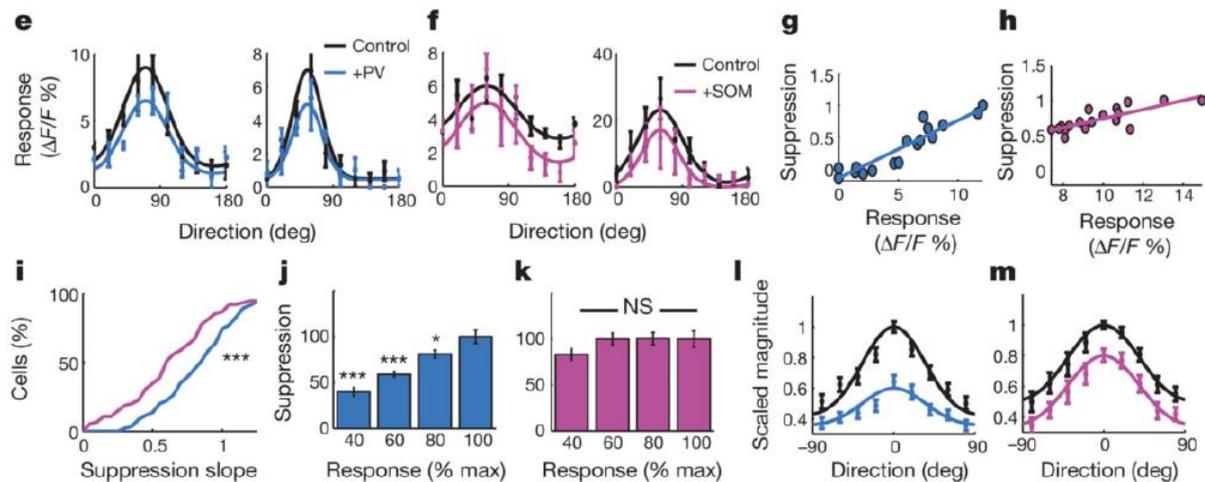


Figure 34 : Effets de la stimulation des interneurons PV ou SOM exprimant la ChR2 sur les réponses sensorielles des neurones pyramidaux. Tiré de [Wilson et al., 2012].

e., f) Courbes de sélectivité à l'orientation des stimuli visuels (drifting grating) de 4 cellules pyramidales avec en noir, les conditions contrôles ; en bleu, la photo-stimulation des interneurons PV exprimant ChR2 ; et en violet, la condition de photo-stimulation des interneurons SOM exprimant ChR2. Les réponses sensorielles sont supprimées lors de la stimulation des PV ou des SOM.

g., h) Représentation graphique de la suppression normalisée, en fonction de l'amplitude de la réponse contrôle pour deux exemples de cellules (en bleu, condition PV activées ; en violet, SOM activées). Le coefficient directeur plus grand pour la courbe bleue indique que la suppression augmente avec l'amplitude des réponses sensorielles, compatible avec un effet de division du gain des neurones. Pour la condition SOM-activées, l'amplitude de la suppression est moins sensible à l'amplitude des réponses sensorielles, compatible avec un effet soustractif.

i) Fonction de densité cumulée des distributions des pentes des courbes en g. et h., pour toutes les cellules supprimées par l'activation des PV (en bleu) et des SOM (en violet).

j., k) Données de toutes les cellules obtenues montrant l'amplitude de suppression induite par les PV et les SOM à différents niveaux de réponses sensorielles. Les astérisques indiquent une différence significative. Pour la condition PV-activées, la suppression est d'autant plus forte que la réponse est ample.

l., m) Courbes moyennes de sélectivité des neurones excitateurs dans la condition contrôle (noir), PV-activées (bleu) ou SOM-activées (violet). À noter l'effet de suppression différentiel de l'activation des PV en fonction de l'amplitude des réponses sensorielles, comme évoqué en g. et j. À l'inverse, l'amplitude de la suppression est relativement la même quelle que soit l'amplitude des réponses sensorielles lorsque les interneurons SOM sont activés, comme évoqué en h.

Les auteurs ont évalués les effets divisifs induits par les interneurons PV et soustractifs par les interneurons SOM suggérés précédemment sur le gain des réponses sensorielles des neurones pyramidaux. Ils ont pour cela mesuré l'amplitude des réponses en fonction des stimulations visuelles de contrastes croissants. La manière dont la manipulation des interneurons PV ou SOM modifie les paramètres des courbes représentatives des relations entrée-sortie permet d'estimer l'effet divisif ou soustractif des suppressions sensorielles. L'activation des interneurons PV diminue la réponse maximale (R_{max}) sans modifier le point de demi-saturation ($C50$), tandis que les interneurons SOM modifient à la fois le R_{max} et le $C50$ (**Figure 35**). L'extrapolation de tels résultats permet aux auteurs de suggérer que la photo-activation des interneurons SOM diminue de manière uniforme les réponses sensorielles des neurones pyramidaux (soustractif), tandis que les interneurons PV

diminuent la pente (divisif) des relations entrée-sortie.

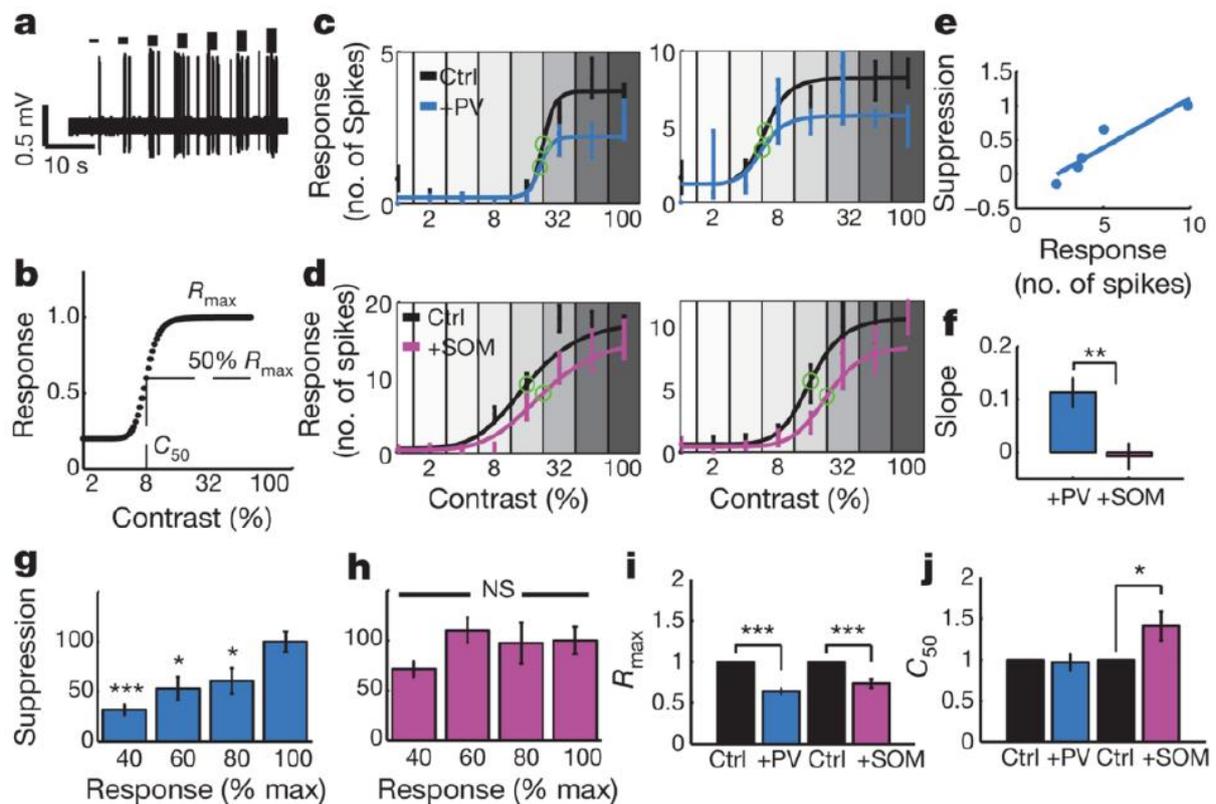


Figure 35 : Effets de la stimulation des interneurons PV ou SOM exprimant la ChR2 sur les réponses à des stimuli visuels de contrastes croissants. Tiré de [Wilson et al., 2012].

- a) Exemple de réponses d'un neurone à des stimuli de type *drifting grating* à l'orientation préférentielle et de contraste croissant.
- b) Détails des différents paramètres d'analyse des relations entrée-sortie sigmoïdale. R_{max} : réponse maximale ; C_{50} contraste à demi-saturation de la réponse.
- c., d) Quatre exemples de cellules dont les réponses aux différents contrastes étaient supprimées par l'activation des PV (bleu) ou les SOM (rose). Les C_{50} sont symbolisés par les cercles verts.
- e) Relations entre l'amplitude de suppression (normalisée) et les réponses sensorielles lors de l'activation des PV (pente = 0.15).
- f) La suppression moyenne versus la pente était significativement plus grande lors de l'activation des PV que celle des SOM.
- g., h) Données populationnelles de l'amplitude des suppressions en fonction de l'amplitude des réponses. L'activation des interneurons PV entraîne une suppression qui croît avec la réponse maximale, alors que les SOM entraînent une suppression uniforme.
- i., j) Modification du R_{max} et du C_{50} lors de l'activation des interneurons PV ou SOM par rapport aux conditions contrôles (Ctrl).

Parallèlement d'autres études ont utilisé des approches optogénétiques pour étudier le rôle des neurones inhibiteurs des différentes couches dans la modulation des réponses sensorielles des neurones des couches de sortie du cortex.

Dans le cortex visuel de la souris, il a été montré que la manipulation spécifique de l'activité des neurones excitateurs de la couche 6 permet de moduler le gain des réponses sensorielles des neurones de la couche 5 (Olsen et al., 2012). Les auteurs ont procédé à des

stimuli visuels de type *drifting grating* de différentes directions, et ont comparé les réponses sensorielles des neurones de sortie du cortex en condition contrôle ou avec la photo-activation/photo-suppression des neurones de la couche 6 qui expriment spécifiquement la ChR2 ou l'Arch (placées sous le promoteur NTSR1, spécifique des neurones cortico-thalamiques L6). Lorsque les neurones excitateurs de la couche 6 sont activés, les réponses sensorielles de la couche 5 sont supprimées (**Figure 36A**). La suppression est plus importante pour la direction préférentielle que pour les autres directions et n'altère pas le profil de sélectivité à la direction du neurone. De plus, la relation linéaire entre les réponses avec et sans photo-activation de la couche 6 indique que cette suppression module le gain des neurones de la couche 5 de manière divisive (**Figure 36B-C**). Les auteurs ont ensuite photo-inhibé la couche 6 (Arch+), ils ont pu observer une augmentation des réponses sensorielles au niveau des neurones des autres couches (**Figure 36D**). De manière cohérente avec les résultats obtenus avec la ChR2, la photo-inhibition de la couche 6 module le gain des neurones de la couche 5 de manière multiplicative (**Figure 36E-F**). Les auteurs ont également reporté une suppression des réponses sensorielles des neurones excitateurs des couches 2/3 et 4 (et 6) identique à celle observée dans la couche 5 lorsque la couche 6 est photo-activée. Dans une étude plus récente, ce même groupe révèle que cette modulation du gain des réponses sensorielles par l'activité des neurones de la couche 6 passe par le recrutement d'interneurones inhibiteurs (exprimant la parvalbumine) de cette même couche qui projette vers toutes les autres couches corticales (**Figure 36G**) (Bortone et al., 2014).

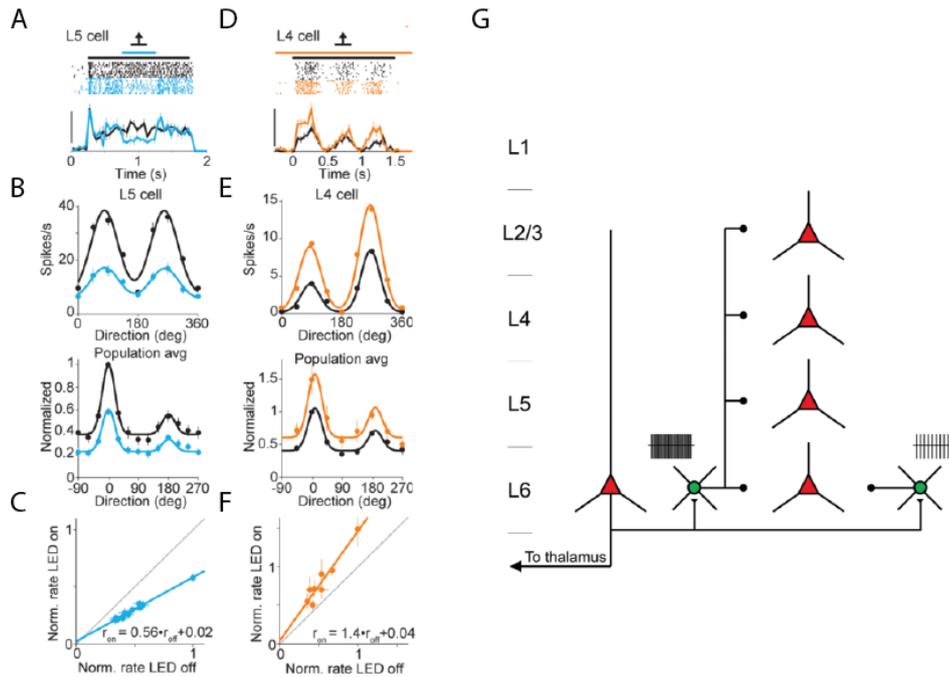


Figure 36 : La couche 6 module de manière bidirectionnelle les réponses sensorielles de la couche 5, sans altérer la sélectivité à la direction. Adapté de [Olsen et al., 2012] et [Bortone et al., 2014]

A) Exemple de la réponse sensorielle d'un neurone de la couche 5 à sa direction préférentielle, en conditions contrôle et avec photo-activation de la couche 6 (bleu).

B) La sélectivité à la direction du neurone en A) n'est pas modifiée malgré la suppression des réponses sensorielles (courbe en bleu). En-dessous, représentation populationnelle de la sélectivité à la direction de tous les neurones de la couche 5 enregistrés en contrôle et avec photo-stimulation de la couche 6.

C) Amplitudes normalisées des réponses sensorielles en condition contrôle (abscisse) et en condition de photo-activation de la couche 6 (ordonnée). La droite en bleu montre la régression linéaire des réponses dont le coefficient directeur est diminué par rapport à la première bissectrice (droite linéaire en gris).

D, E, F) Idem qu'en A, B, C) pour la condition de photo-inhibition des neurones excitateurs (Arch+) de la couche 6.

G) Schéma de la connectivité corticale qui sous-tend la modulation du gain des réponses sensorielles des différentes couches. Les neurones cortico-thalamiques (en rouge) recrutent des interneurons PV de la couche 6 qui contactent les cellules excitatrices des autres couches corticales.

Enfin une étude récente a exploré le rôle de la manipulation des neurones excitateurs de la couche 4 dans le contrôle des réponses sensorielles des neurones des autres couches et en particulier celles des neurones de la couche 5. Cette étude suggère dans un premier temps que la photo-inhibition spécifique des neurones excitateurs de la couche 4 (Halorhodopsine, eNpHR3+) conduit à la suppression des réponses sensorielles des couches 2/3 (**Figure 37A**) (Pluta et al., 2015). Ce résultat confirme l'hypothèse formulée par Guilbert & Wiesel quant au rôle des neurones excitateurs de la couche 4 dans le déterminisme des réponses sensorielles des neurones des couches superficielles. Par contre, et de manière surprenante, cette même manipulation entraîne une augmentation de l'amplitude des réponses sensorielles des neurones de la couche 5 (**Figure 37A-B**). A l'inverse, la photo-activation de la couche 4 entraîne une facilitation des couches 2/3 et une suppression des réponses sensorielles dans la

couche 5 (**Figure 37C-D**). Les auteurs ont par ailleurs constaté par des enregistrements intracellulaires en *patch-clamp* que les interneurons de type *fast spiking* de la couche 5 reçoivent moins d'entrées synaptiques excitatrices au cours de la photo-inhibition de la couche 4. Ce résultat suggère que la couche 4 projette des afférences excitatrices directes vers les interneurons de la couche 5. La photo-inhibition de ces afférences excitatrices pourrait entraîner une levée d'inhibition des neurones pyramidaux, expliquant ainsi la facilitation observée. Pour tenter d'expliquer les mécanismes sous-jacents à ce résultat, les auteurs ont procédé à des expériences *in vitro*. Leur hypothèse était que la photo-activation de la couche 4 (ChR2+) pourrait exciter directement les interneurons inhibiteurs de la couche 5, qui inhiberaient ensuite les neurones pyramidaux. Ils ont pour cela enregistré en intracellulaire *in vitro* des interneurons de la couche 5 et observé une activation supraliminaire consécutive à la photo-activation de la couche 4. Afin de déterminer l'existence potentielle d'une connexion directe entre les neurones excitateurs de la couche 4 et les interneurons de la couche 5, les auteurs ont procédé à des paires d'enregistrements intracellulaires *in vitro*. Ces enregistrements leur ont permis de montrer l'existence d'une connexion monosynaptique directe (*feedforward*) entre les neurones excitateurs de la couche 4 et les interneurons de la couche 5. L'inhibition des neurones pyramidaux de la couche 5 par les interneurons recrutés par cette voie inhibitrice translaminaire L4-L5 persistait lorsque les auteurs ont procédé à une ablation des couches 2/3, renforçant l'hypothèse d'une voie inhibitrice directe.

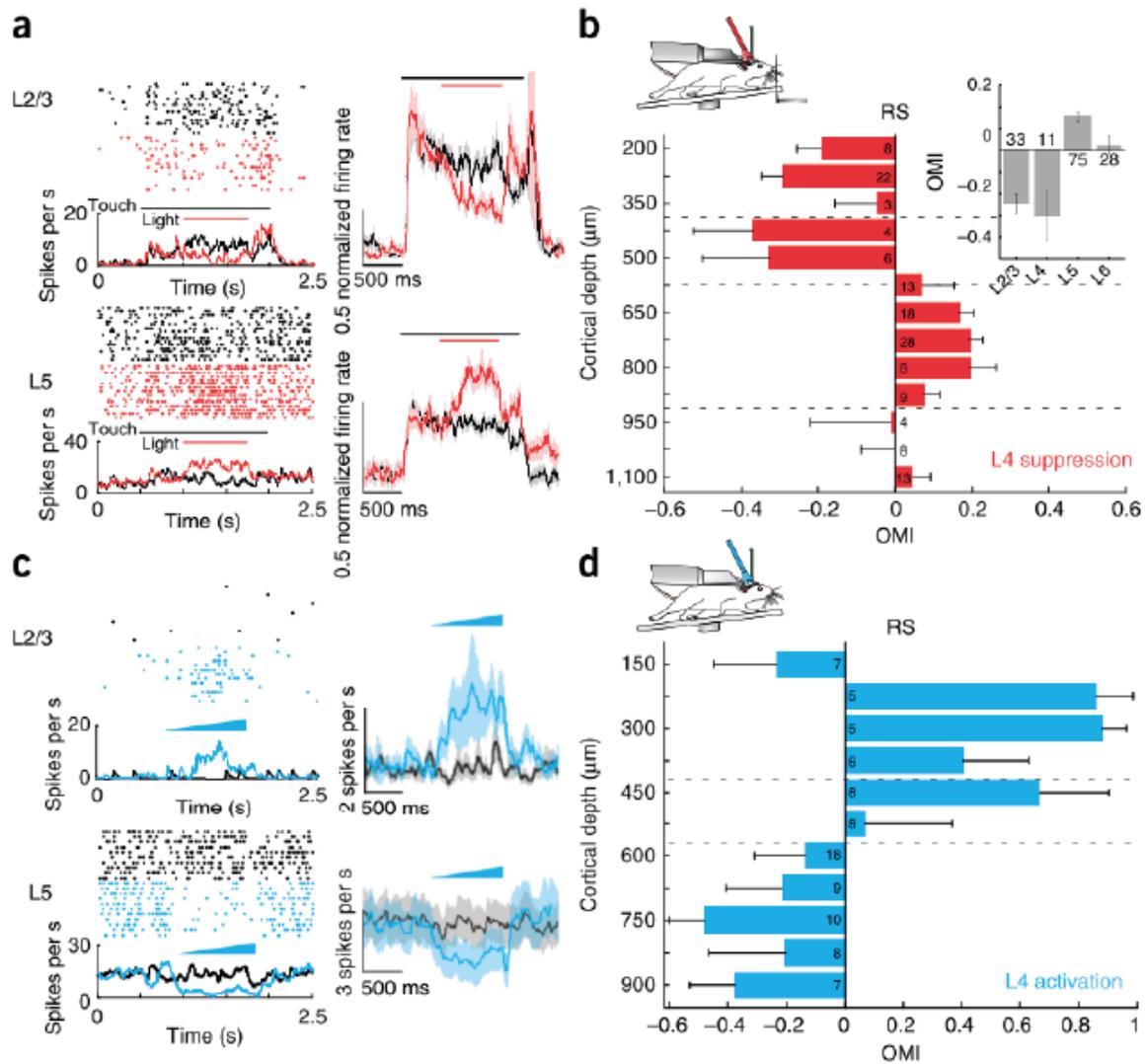


Figure 37 : Effets bidirectionnels de la manipulation de l'activité des neurones excitateurs de la couche 4 sur les réponses sensorielles des couches 2/3 et 5. Tiré de [Pluta et al., 2015]

a) Les PSTH et représentations en raster montrent que la photo-inhibition (en rouge) de la couche 4 supprime les réponses sensorielles des neurones supposés excitateurs des couches 2/3 (en haut) et facilite celle des neurones supposés excitateurs de la couche 5 (en bas) par rapport à la condition contrôle (en noir).

b) Histogramme des index de modulation optogénétique (OMI) induits par la photo-inhibition de la couche 4 en fonction de la distribution laminaire des neurones enregistrés. Un OMI négatif indique un effet suppressif sur les réponses sensorielles, un OMI positif reflète un effet facilitateur.

c, d) Comme en a, b) pour les expériences de photo-activation des neurones excitateurs de la couche 4 (en bleu).

De l'ensemble des résultats obtenus via les manipulations optogénétiques, il est possible de supposer que l'inhibition pharmacologique de la couche 4 peut entraîner des effets antagonistes sur les propriétés intégratives des neurones de la couche 5 : cela induit une levée d'excitation des neurones des couches 2/3 de manière concomitante à une levée d'inhibition des neurones de la couche 5. Les résultats obtenus par Pluta et collaborateurs indiquent donc de potentiels effets antagonistes de l'inactivation pharmacologique de la couche 4 réalisée par Constantinople & Bruno. Cette manipulation entraîne une suppression des réponses sensorielles des neurones des couches 2/3 et une levée d'inhibition des neurones de la couche 5 par une voie translaminaire directe.

Dans ce contexte, le rôle spécifique du recrutement des neurones pyramidaux des couches 2/3 sur le traitement sensoriel opéré par les neurones de la couche 5 reste à mettre en évidence.

D. Résultats

Préambule

Chez les mammifères, les aires corticales primaires sont caractérisées par une organisation tangentielle en colonnes fonctionnelles au sein desquelles les neurones partagent les mêmes champs récepteurs. Par ailleurs, chaque colonne est divisée en six couches. À partir de données anatomiques, un modèle dit « canonique » de traitement de l'information sensorielle a été proposé. Selon ce modèle, il existerait un traitement sériel des informations sensorielles à travers les différentes couches de chaque colonne corticale.

Ce modèle, proposé par Gilbert et Wiesel à la fin des années 60, stipule que le traitement cortical de l'information sensorielle serait d'abord prétraité dans la couche 4 (L4) du cortex qui reçoit les informations en provenance du monde extérieur par le thalamus. Ces informations seraient ensuite relayées aux couches superficielles (L2/3) par les neurones excitateurs de la couche 4 puis aux neurones des couches profondes qui sont densément innervés par les neurones pyramidaux glutamatergiques des couches 2/3 et qui constituent la principale sortie du cortex. Ainsi, le rôle de la connectivité interlaminaire L2/3-L5 dans le traitement sensoriel reste à ce jour non élucidé.

C'est dans ce contexte que nous avons employé une approche optogénétique pour i) évaluer comment les propriétés de la connectivité interlaminaire entre les neurones des couches 2/3 et les neurones de la couche 5 dépendent de l'activité des neurones des couches superficielles *in vitro*, et ii) déterminer son implication dans le traitement sensoriel opéré par les neurones des couches profondes chez la souris anesthésiée ou éveillée.

Nous avons réalisé cette étude au niveau du cortex somesthésique qui traite les informations en provenance des vibrisses, un modèle d'étude très populaire en neurophysiologie de la perception. En effet, alors que les primates utilisent en général leurs doigts afin de procéder à des explorations tactiles de leur environnement extérieur, les rongeurs le font en utilisant leurs vibrisses (Wilent and Contreras 2004 ; Ritt et al. 2008). De par sa taille, ce système est le plus grand des circuits sensoriels chez le rongeur, est très facile d'accès et possède un corrélat anatomique qui permet de distinguer les colonnes corticales : « les barrels » ou tonneaux des couches IV pouvant être révélés à l'aide d'un marquage à la cytochrome oxydase (Diamond and Arabzadeh 2013).

Nous avons dans un premier temps exprimé la Channelrhodopsine-2 (ChR2) à la

surface des membranes des neurones excitateurs pyramidaux des couches 2/3 du cortex à tonneaux grâce à la technique d'électroporation *in utero*. Cette stratégie nous a permis de stimuler de manière spécifique, réversible et temporellement précise l'activité des neurones des couches 2/3 à différentes fréquences allant de 3 à 30 Hz, et d'en étudier les effets sur l'excitabilité des neurones pyramidaux de la couche 5 en procédant à des enregistrements intracellulaires (patch-clamp) *in vitro*. En effet, les études qui avaient été précédemment effectuées *in vitro* ont essentiellement été conduites en présence de bloquant de la transmission synaptique GABAergique ou bien en réalisant des enregistrements intracellulaires en configuration voltage-imposé au potentiel d'inversion du chlore. Or cette connexion L2/3-L5 est complexe, elle recrute à la fois des neurones excitateurs de la couche 5 mais active également de manière disynaptique des interneurons inhibiteurs. Il est possible que ces circuits excitateurs et inhibiteurs soient différemment recrutés en fonction du patron d'activité des neurones des couches 2/3.

Nous avons d'abord réalisé des enregistrements des neurones de la couche 5 en configuration voltage-imposé. La comparaison des composantes excitatrices et inhibitrices des courants évoqués par la photo-stimulation des neurones pyramidaux des couches 2/3 indique que ces stimulations évoquent une augmentation des conductances inhibitrices et excitatrices évoquées quelque soit leur fréquence.

Afin de déterminer l'effet net de ces conductances excitatrices et inhibitrices évoquées par les photo-stimulations à différentes fréquences sur le patron d'activité des neurones pyramidaux de la couche 5, nous avons ensuite réalisé dans les mêmes conditions des enregistrements intracellulaires en configuration courant-imposé. Nous avons observé que la fréquence de décharge des neurones (excitateurs mais aussi inhibiteurs) de la couche 5 augmentait avec la fréquence de la photo-stimulation.

Enfin, nous avons évalué l'impact de la manipulation de l'activité des neurones des couches 2/3 sur l'activité des neurones des couches profondes en réponse à des stimuli vibratiles de la vibrisse principale (30 Hz pendant 1 s). Nous avons pour cela exprimé l'Archeorhodopsine-3 (Arch-3) dans les neurones pyramidaux des couches 2/3 afin de photo-inhiber de manière réversible leur activité (stimulation continue de 2 s, démarrant 500 ms avant la stimulation sensorielle). Dans ces conditions, nous avons réalisé des enregistrements extracellulaires chez des animaux anesthésiés et éveillés des réponses sensorielles des neurones des couches profondes en condition contrôle et avec la photo-suppression de l'activité des neurones des couches 2/3.

Tout d'abord, nous avons vérifié que les réponses des neurones des couches superficielles à des stimuli soutenus de la vibrisse principale étaient supprimées par la photostimulation des neurones des couches 2/3 exprimant l'Arch-3. Ensuite, nous avons étudié les effets de la photo-suppression de l'activité des neurones des couches 2/3 sur les réponses sensorielles des neurones de la couche 5. Cette photo-inhibition entraînait une suppression à hauteur de 30% de l'amplitude des réponses sensorielles des neurones des couches profondes. Ainsi, pour la première fois, nous démontrons que l'activité des neurones des couches 2/3 amplifie les réponses sensorielles des neurones de la couche 5.

Par ailleurs, l'effet de l'activité des neurones des couches 2/3 sur les réponses sensorielles des neurones de la couche 5 ne se traduisait pas uniquement par la simple amplification des réponses. En effet, nous avons démontré que l'amplitude de la suppression des réponses sensorielles dépend de la vitesse du stimulus : la suppression était d'autant plus forte que les vitesses étaient élevées. Cette modulation dépendante de l'intensité du stimulus est congruente avec une modification multiplicative du gain des réponses sensorielles des neurones de sortie de la couche 5.

L'ensemble de nos résultats montrent pour la première fois i) que les neurones excitateurs des couches 2/3 jouent un rôle majeur dans le transfert des informations sensorielles vers les neurones de la couche 5 et ii) que l'activité de ces neurones amplifie les réponses sensorielles et implémente une modulation du gain des fonctions de transfert des neurones de sortie du cortex.

Articles

Layer 2/3 pyramidal neurons tune the gain of the cortical output.

Michael Quiquempoix, Sophie Fayad, Katia Boutourlinsky, Nathalie Leresche, Régis C. Lambert, Thomas Bessaih.

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France.

Correspondence should be addressed to Thomas Bessaih, Department of Neuroscience Paris Seine, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard, Paris, 75005. E-mail: thomas.bessaih@upmc.fr.

Key words:

Sensory processing, cortical connectivity, gain control, whisker, barrel cortex.

Author contributions:

T.B., N.L., R.L. and M.Q. conceived the study. M.Q. performed and analyzed all of the *in vivo* extracellular experiments. S.F. performed and analyzed all of the *in vitro* circuit-mapping experiments. K.B. provided technical assistance. T.B. and M.Q. wrote the paper.

Abstract:

A striking feature of primary sensory areas is their organization into functional columns among which neurons share the same receptive field properties. Each column is vertically divided into six layers; however the role of such laminar organization is still poorly understood. Initial anatomical and physiological studies suggested that the sensory information relayed from the thalamus is serially processed in cortical columns. It is supposed to propagate from layer 4 (L4) up to L2/3 and down to L5, which constitutes the main output of the cortex. However, more recent *in vivo* experiments involving pharmacological inactivation of L2/3 point toward the existence of a direct processing of thalamic input by L5.

Therefore, the role of the L2/3 to L5 pathway in sensory processing is now highly debated. Using cell-type specific and reversible optogenetic manipulation in the somatosensory cortex of anesthetized and awake mice, we demonstrate that L2/3 pyramidal neurons finely control the gain of sensory responses in L5 neurons.

Introduction:

All primary sensory cortical areas are divided vertically into 6 layers; however the role of such laminar organization in sensory processing is a matter of controversy (Douglas and Martin, 2007; Harris and Shepherd, 2015). Pioneering anatomical reconstruction of physiologically identified neurons suggested the existence of a canonical circuit model, within which sensory information is serially processed (Gilbert and WIESEL, 1979). In this model, sensory information is first preprocessed in L4, which constitutes the main thalamo-recipient layer. Then sensory information is sent up to L2/3, which constitutes the main output of excitatory L4 neurons. Eventually, sensory information propagates down to L5 neurons, which receive dense excitatory projections from L2/3 pyramidal neurons and drive subcortical structures involved in action such as the basal ganglia, the colliculus and the spinal cord (Douglas and Martin, 2004).

This canonical model was further supported by paired recordings, glutamate uncaging and channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping experiments in slices (Petreanu et al., 2007; Lefort et al., 2009; Hooks et al., 2011). Indeed, all these studies showed that L4 to L2/3 and L2/3 to L5 pathways are the most powerful translaminar excitatory connections in primary sensory areas. However, subsequent anatomical experiments revealed that thalamocortical axons also innervate deep layer neurons (Wimmer et al., 2010). Furthermore, both *in vitro* and *in vivo* physiological experiments confirmed the existence of functional excitatory connections between thalamic and L5 neurons, which challenges the serial model (Bureau et al., 2006; Constantinople and Bruno, 2013).

More surprisingly, a recent study involving a pharmacological approach failed to unravel any systematic effect of the inactivation of layer 2/3 on the sensory responses of most L5 neurons of the rodent somatosensory cortex, suggesting a functional disconnection between superficial and deep layers during sensory processing (Constantinople and Bruno, 2013). However, one limitation of this study is the use of a non-reversible manipulation that is not specific to any particular cell type. This might lead to confounding effects related to the concomitant

manipulation of multiple neuronal circuits with potentially opposed effects on downstream elements (Pluta et al., 2015). Furthermore, the experiments have been performed only under anesthesia, a state in which spontaneous and sensory evoked cortical dynamics are known to be altered (Haider et al., 2013). Finally, only transient stimuli of relatively low velocity were used, while it is known that in the natural environment sensory stimuli are often sustained and have complex temporal structures (Ritt et al., 2008; Wolfe et al., 2008; Lottem and Azouz, 2009). Sustained stimulations lead to adaptation in cortical networks, a regime during which, excitatory and inhibitory circuits are differentially recruited (Higley and Contreras, 2006; Katz et al., 2006). Indeed, the L2/3 to L5 pathway is complex. Pyramidal L2/3 neurons are a direct source of excitatory input to L5 pyramidal neurons, but they also indirectly inhibit them by exciting GABAergic cells located either in L2/3 or in L5 (Helmstaedter et al., 2009; Adesnik and Scanziani, 2010; Kätzel et al., 2011). Consequently, the scale and the sign of the modulation of L5 excitability by L2/3 pyramidal neurons (enhancement or suppression) will depend on the interactions and balance between di-synaptic feedforward inhibition and monosynaptic excitation, which might be activity dependent (Pouille and Scanziani, 2004; Crandall et al., 2015).

In the present study, we used an optogenetic approach strategy to investigate the activity dependent properties of the L2/3 to L5 pathway *in vitro* and its contribution to the sensory processing operated by deep layer neurons of both anesthetized and awake animals. We explored these questions in the whisker to barrel system of mice. Indeed, while human and non-human primate use their fingers to gather information about their nearby environment, rodents proceed to tactile explorations using their whiskers (Diamond et al., 2008). Because each cortical column that receive information about whisker motions is defined by a L4 structure called a barrel, which can be clearly visualized, the barrel cortex of rodents is an attractive model system for the study of cortical connectivity (Woolsey and Van der Loos, 1970).

Methods:

Experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines of the Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) recommendations and with the approval of the French National Ethic Comity for Sciences and Health report (authorization number: 02564.02)

In utero electroporation.

The constructs were inserted into pCAGGS vector modified for *in utero* electroporation. DNAs were purified and concentrated using Qiagen plasmid preparation kits and dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0).

L2/3 progenitor cells were transfected via *in utero* electroporation. Embryonic day 16 timed-pregnant C57BL/6J mice (Janvier labs) were deeply anesthetized using an isoflurane-oxygen mixture (2 to 3% of isoflurane in O₂) delivered by an anesthesia regulator (Tem Segal). The uterine horns were exposed and 1 μ L of DNA solution with 0.05 % of Fast Green (Sigma) was pressure injected (Picospritzer, General Valve) through a pulled glass capillary tube (30–40 μ m tip diameter) into the left lateral ventricle of each embryo. The DNA solution contained either a mixture of plasmids encoding ChR2-Venus and GFP in a 3:1 molar ratio or only the plasmid encoding ArchT-GFP. In both cases, final concentration of DNA was set to be 2 μ g/ μ L. The head of each embryo was placed between tweezer electrodes (NEPA GENE), with the positive plate contacting the left side of the head. Electroporation was achieved with five square pulses (duration 50 ms, frequency 1 Hz, 45 V). The uterus was then returned to the abdominal cavity, and the abdominal wall and skin were sutured. Buprenorphine was given for post-operative analgesia (0.05 mg/kg, twice at 8 hr interval). Pups were born by natural delivery.

GFP fluorescence was used to screen for positive animals under a fluorescent dissecting scope (MVX10, Olympus), 1 day after birth. The transfected cortical region in electroporated animals was always restricted to L2/3 in the electroporated hemisphere and usually encompassed most of the somatosensory cortex. Only pups showing strong fluorescence in the GFP emission band in the somatosensory cortex at postnatal day 1 were used in later experiments.

Slice preparation.

Adult mice (4 to 5 weeks) mice were anesthetized with isoflurane before decapitation. After isolation, the portion of the brain containing the barrel cortex was placed in bicarbonate-buffered saline (BBS) at 2–5 °C for a few minutes. Slices (300 μ m) were then cut using a vibratome (Leica). The slicing procedure was performed in an ice-cold solution containing (in mM): 130 potassium gluconate, 15 KCl, 0.05 EGTA, 20 HEPES, 25 glucose, 1 CaCl₂ and 6

MgCl₂, supplemented with 0.05 D-APV. Slices were then transferred for a few minutes to a solution containing (in mM): 225 D-mannitol, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 25 glucose, 1 CaCl₂ and 6 MgCl₂, and finally stored for the rest of the experimental day at room temperature in oxygenated BBS, containing: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 25 glucose (osmolarity: 305 mosM ;pH 7.3 after equilibration with 95% O₂ and 5% CO₂). For all recordings, slices were continuously perfused with oxygenated BBS at 32–34 °C.

In vitro electrophysiological recordings.

Brain slices were screened for electroporated neurons using a filter set that allowed us to detect GFP fluorescence. Neurons were visualized under infrared differential interference optics and patched with borosilicate pipettes (resistance 3–5 MOhm). The intracellular solution contained 120 mM potassium gluconate, 5 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1.1 mM EGTA, 4 mM magnesium ATP, 0.4 mM disodium GTP, 15 mM sodium phosphocreatine and 2mg/ml of biocytin (pH 7.3; 290mOsm). Cells were recorded at a depth of 50–95 μm in the brain slice. For photo-stimulation/photo-inhibition protocols, we used either a blue (470 nm) or a green LED (530 nm; Prizmatix) delivered through a 200 μm optical fiber (0.4 NA) at the surface of the slice.

Patch-clamp electrodes were connected to a Cairn Optopatch amplifier. Protocols and acquisitions were controlled by PClamp software (Molecular Devices). The membrane currents and potentials were filtered by a 4-pole Bessel filter set at a corner frequency of 2 kHz, digitized on-line at a sampling rate of 10 kHz and later analyzed using Igor Pro software (wavemetrics). Data were not collected until 10 min after patch rupture to allow the internal and external solutions to equilibrate.

Surgery and Preparation for in vivo electrophysiological Recordings.

Adult mice (4 to 6 weeks) were anesthetized with isoflurane vaporized in a mixture of oxygen and air (5% for induction, 2% during surgery). Body temperature was maintained at 37°C via servo-controlled heating blanket and rectal thermometer (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Bupivacaine (Subcutaneous) was administered in the regions to be incised 15 min prior to the first incision. Mice were placed in a stereotaxic apparatus and a craniotomy was made directly above the barrel cortex (-1.0 to -2.0 mm A/P, 3.0 to 4.0 mm M/L). To minimize damage

during electrode penetration, the dura was resected across the majority of the craniotomy using a dura hook and the exposed surface was coated with a layer of silicon oil.

After electrodes placement, isoflurane was replaced by Fentanyl (10-40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IP) mixed with xylazine (4 mg/kg , IP) in order to maintain the animal in a sedated state. Additional doses of fentanyl (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were administered every approximately 2 hours. If the animals presented any sign of discomfort, isoflurane (0.25 to 1 %) was added to supply this anesthesia regime. The depth of anesthesia was monitored by heart rate (maintained between 300 and 600 beats/min), pupil dilation, pinch reflex, and following the opening of the craniotomy by the level of synchronous activity in the local field potential (LFP). Electrodes were inserted into the brain perpendicular to the surface and lowered to layers 2/3 or 5 under visual guidance and based on readings from the micromanipulator (depths: 200 to 300 μm or 550 to 700 μm , for layer 2/3 and layer 5 recordings respectively).

For separate set of animals ($n = 4$), a survival surgery was performed 1 week prior to multiple recording sessions. During this surgery, a headpost was permanently implanted and a craniotomy over the barrel cortex was performed. The exposed cortex was covered with silicon oil and the opening resealed. Mice were injected with 0.05 mg/kg of buprenorphine subcutaneously and monitored daily. They were also given a course of antibiotics through the water supply (BAYTRIL, Bayer) to prevent infection and were allowed to recover for 2 days following implant surgery before they were trained to run on a circular treadmill (Fast-Trac, Bio-Serv). Mice were headposted in place for increasing intervals on each successive day. If signs of anxiety or distress were noted, mice were removed from the headpost and the training interval was not lengthened on the next day. Mice were trained on the treadmill for up to 5 days or until they exhibited robust bouts of running activity during each session. Mice that continued to exhibit signs of distress were not used for awake electrophysiology sessions.

On the day of recording, the temporary seal over the barrel cortex was removed, and tetrodes lowered as described above. Mice were allowed to run freely and transitioned between passive and active behavioral states. At the end of a recording session, the craniotomy was flushed with saline and sealed again. On subsequent recording days, the craniotomy was flushed with saline before placing the electrode array in a new recording site. Recordings were performed mainly in the second half of the light portion of the day/light cycle.

In vivo electrophysiological Recordings.

Cortical recordings of units were obtained using quartz-insulated platinum/tungsten (90%/10%) tetrodes (~1–2 M Ω , Thomas Recording). 1 to 3 tetrodes were guided independently at 1 μ m resolution through a five-channel concentric microdrive head (Head05-cube-305-305-b, Thomas Recording GmbH) with 305 μ m inter-electrode spacing.

Raw signals were filtered (600–6000 Hz; Neuralynx recording systems), amplified (5000x), digitized at 33,657 Hz, and stored with stimulus markers. Waveforms crossing set thresholds (250–500 μ V) were captured via the A/D card and analyzed off-line. Potential single-units were first identified using automated clustering software utilizing peak and trough feature sets (KlustaKwik). These clusters were then examined manually for waveform shape (SpikeSort3D, Neuralynx). Clusters that captured waveforms from the same unit were combined and upon examination of the interspike intervals, multi-units clusters were discarded. Clustering extracellular action potential waveforms from the different wires in a tetrode typically enabled discrimination of 1 to 3 units.

For photo- inhibition protocols, we used a green LED (530 nm; Prizmatix) delivered through a 1 mm diameter optical fiber (0.4 NA). The tip of the optical fiber was positioned 2 to 4 mm above the exposed surface of the brain with the aid of a micromanipulator.

Before recording, whiskers were trimmed to approximately 6–7 mm. Individual whiskers were mechanically deflected using a ceramic piezoelectric bimorph stimulator (Physik Instrumente GmbH) as described previously (Wilent and Contreras, 2005). For each recording, a glass capillary glued to the end of the stimulator was positioned so that a single whisker rested snugly inside it. The tip of the capillary was positioned approximately 4 to 5 mm from the skin. The whisker was mechanically deflected in the rostral-caudal direction (250 μ m) by applying cosine waves (30 Hz) of 1 sec duration to the stimulator. Stimuli were delivered at a rate of 0.2 Hz. The identity of the principal whisker was determined for each animal based on the cortical multi-unit activities. The whisker that evoked the response with the shortest onset latency and largest number of action potentials was considered to be the principal whisker (PW). Depending on the recording session, we applied 30 to 60 trials per stimulus condition.

Single units were included in the analysis if their responses were >2 Hz, sustained and had a short onset latency (<25 ms). To test whether single unit responses were significant, peri-stimulus time histograms (PSTHs) were computed for each unit.

The second preceding the stimulus was divided into 25-ms bins, the number of spikes per bin was summed across trials, and the mean number of spikes per prestimulus bin was calculated. The number of spikes in the 25 ms following the stimulus was summed across trials, and this total was compared with a Poisson distribution with μ equal to the mean number of spikes per prestimulus bin. If the probability $P(x)$ of observing an equal or greater number of spikes was $<1\%$, the response was considered significant.

$P(x) = (e^{-\mu})(\mu^x)/x!$, where x is the number of action potentials in the first bin after stimulus presentation and μ is the average number of action potentials per bin during 1 s of baseline spiking (40 bins) before stimulus presentation.

Histology.

Adult mice (4 to 6 weeks) were deeply anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), and the brain was removed. Brains were post-fixed for 2 hours and cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M PB for several days. Then, 60 μM coronal sections were cut with a vibratome (Microm).

Sections were blocked with 0.2% Triton X-100 and 5% Bovin Serum Albumine (BSA) for 2 hours at room temperature followed by the antibody to green fluorescent protein from chicken (1:1000, Chemicon) overnight at 4 °C.

To determine the fraction of electroporated cells, sections were also stained for the pan-neuronal marker Neu-N with mouse anti-NeuN antibody (1:200, Invitrogen).

Sections were then washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 1 hour at room temperature with Alexa-488 conjugated goat anti-chicken secondary (1:500, Invitrogen) either alone or with Alexa-594 conjugated goat anti-mouse secondary (1:200, Invitrogen).

Biocytin-filled neurons were revealed after incubation with Streptavidine-Rhodamine-RedX antibody (1:1000 dilution, Invitrogen) for 4 hours.

Sections were rinsed 3 times in PB and mounted in Fluoromount. Images were obtained by confocal microscopy (Zeiss LSM 710 Axio Observer).

In some of the *in vivo* electrophysiological recordings, prior to insertion, the rear of a the tetrodes were painted with fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (diI, 10% in ethanol, Invitrogen). As this dye is a lipophilic neuronal tracer,

uptake into adjacent neurons and processes allowed assessment the depth of the recordings. Immediately after euthanasia the cortical region of interest was blocked in situ, removed, and bathed in chilled PBS. After carefully removing the pia mater, 300 to 400 μm -thick coronal sections were cut on with a vibratome. Sections were then mounted on glass slides and cover-slipped in Fluoromount mounting medium.

Statistics.

Non-parametric statistics were used throughout the manuscript to avoid making assumptions inherent to parametrical testing, except for linear regression analysis, as we were explicitly interested in testing for linear relationships. Therefore, between conditions comparison was based on a Wilcoxon rank-sum test (Mann-Whitney U test) for unpaired data or Wilcoxon signed-rank test for paired data.

Results:

ChR2-mediated photo-stimulation of L2/3 pyramidal neurons.

To achieve fast and reversible activation of L2/3 pyramidal neurons, we introduced the light-sensitive cation channel Channelrhodopsin-2 (ChR2-Venus) (Nagel et al., 2003) together with GFP in a region that includes the left primary somatosensory cortex (S1) using *in utero* electroporation (IUE; Fig. 1A, left panel) (Saito and Nakatsuji, 2001). We confirmed histologically that the expression of the opsin was restricted to L2/3 pyramidal neurons and their axons, with no expression in the somata of neurons located in other layers (Fig. 1A, middle panel). Labeled axons ramified in L2/3 and L5. In L4, the density and path of the axons was such that gaps in fluorescence that shape barrels were observable (Fig. 1A, middle panel). As expected, 99.2 % of fluorescent neurons had pyramidal morphology (Fig. 1A, right panel; n=3185 cells from 4 animals). Overall, 19.48 \pm 0.03% of L2/3 neurons (identified by immune-staining for Neu-N) also expressed fluorescence in the GFP emission band, which is consistent with previous observations in S1 (Fig. 1B) (Adesnik and Scanziani, 2010; Shao et al., 2013).

To confirm that ChR2 formed functional membrane channels in transfected neurons and did not alter their intrinsic excitability, we first performed whole-cell recordings from GFP positive neurons in slices from P30-40 mice that had undergone IEU. When recorded in current-clamp configuration, one second depolarizing pulses evoked adapting firing pattern

characteristics of regular spiking cortical cells, at rates below 100 Hz in all GFP positive neurons (n=8 from 4 animals; Fig. 2B).

Then, neurons were held at -70 mV in voltage-clamp configuration in the presence of the glutamate receptor blocker CNQX (10 μ M) to avoid contaminations from synaptically evoked activities. Brief (1 to 2ms) pulses of blue (470 nm) light (5 to 10 mW) of different frequencies (3 to 40 Hz) were applied at the surface of the slice. Such stimulations elicited inward currents (>50 pA) with rapid kinetics in all GFP positive neurons (Fig. 2C).

To analyze the coupling between photostimulations and action potential generation, we recorded GFP positive neurons in current-clamp configuration again (Fig. 2D). For each stimulation frequency, we calculated the probability of evoking action potentials as a function of the pulse number in the train (Fig. 2E). We found that light-evoked firing did not show adaptation and the reliability of each pulse in the train at evoking an action potential did not change as a function of the stimulation frequency (up to 30 Hz).

Activity dependent modulation of L5 neurons excitability by L2/3 pyramidal neurons.

A previous study demonstrated that photo-initiated gamma band (around 30 Hz) oscillatory activity drives both excitatory and inhibitory post-synaptic currents (EPSCs and IPSCs) in L5 pyramidal neurons (Adesnik and Scanziani, 2010). However, it is possible that excitatory and inhibitory circuits may be differentially recruited by distinct activity patterns in L2/3, resulting in different relationships between excitation and inhibition in L5 pyramidal neurons. In order to address this point, we performed whole cell recordings from L5 pyramidal neurons while initiating synchronous activities of different frequencies in L2/3 pyramidal neurons with light stimulations.

Fig.3A and 3B illustrate a recording from a representative morphologically identified regular spiking L5 pyramidal neuron. We voltage clamped L5 pyramidal neurons at the IPSC reversal potential (around -70 mV) and at the EPSC reversal potential (around 0 mV) to isolate EPSCs and IPSCs, respectively (Fig. 3C). This approach allowed us to compare the evolution of the evoked excitatory and inhibitory charges as a function of the stimulation frequency of L2/3 pyramidal neurons (Fig. 3D). In our recording condition, 79% of L5 pyramidal neurons received an excitatory input at all stimulation frequencies (n=19 out of 24 neurons from 14 animals), which might be related to the slice cutting procedure. While the excitatory charges were around -10 +/- 1.5 pC for a stimulation frequency of 3 Hz, they tended to increase up to

-110 +/- 33 pC for a stimulation frequency of 30 Hz. Similarly, inhibitory charges also increased with the stimulation frequency from a value of about 75 +/- 25pC for a stimulation frequency of 3 Hz, to 320 +/- 70pC for 30 Hz. Therefore, whatever the stimulation frequency of L2/3 pyramidal neurons, L5 pyramidal neurons received both excitatory and inhibitory conductances. Furthermore, we found that the magnitude of both conductances increased as a function of the stimulation frequency.

To understand the role of L2/3 pyramidal neurons in modulating the excitability of L5 neurons, we addressed how the two matched but opposing conductances affect the neuronal spiking. We recorded from L5 pyramidal neurons in the current-clamp configuration. By injecting positive currents, we hold them at membrane potentials close to -60 mV (Fig 3E; n=19 neurons from 14 animals), a level comparable to what has been observed *in vivo* (Constantinople and Bruno, 2011).

At these membrane potentials, we found that whatever the stimulation frequency was, light pulses invariably evoked an increase in the spiking activity that weakly adapted for the duration of the stimulus (Fig 3E). In order to quantify the magnitude of this modulation as a function of the stimulation frequency, we measured mean firing rates across the entire 1 sec stimulus duration averaged across trials. Firing rates showed a positive slope when plotted as a function of stimulation frequency (Fig 3F). This effect was not specific to L5 pyramidal neurons, as we observed similar positive correlation in morphologically identified non-pyramidal L5 fast-spiking neurons (n= 9 neurons from 6 animals; Fig. 4).

This result confirms that L2/3 pyramidal neurons can exert powerful excitatory influence on L5 pyramidal neurons and that this effect is activity dependent. Next we investigated whether L2/3 input is involved in the sensory processing performed by L5 neurons. Therefore, we designed an approach to specifically and reversibly inactivate L2/3 pyramidal neurons while recording sensory evoked responses in deep layer neurons.

Arch-mediated photo-inhibition of sensory evoked responses in L2/3 pyramidal neurons.

To achieve fast and reversible inactivation of L2/3 pyramidal neurons, we introduced the light-sensitive proton pump Archaeorhodopsin (Arch-GFP)(Chow et al., 2010) in a region that includes the left primary somatosensory cortex (S1) using *in utero* electroporation. To confirm that Arch formed functional membrane pumps in transfected neurons and did not

alter their intrinsic excitability, we performed whole-cell recordings from GFP positive neurons in slices from P30-35 mice that had undergone IEU (Fig. 5A). In all GFP positive neurons (n=8 from 3 animals), 1-second depolarizing pulses evoked adapting firing pattern characteristics of regular spiking cortical cells, at rates below 100 Hz (Fig. 5B). While neurons were held at membrane potentials at which they exhibit sustained discharges (6 to 12 Hz), green light from a 530 nm LED (2 to 5 mW) was flashed at the surface of the slices via an optic fiber. Light pulses (1-second duration at 0.1 Hz) evoked large (>30 mV), reliable and reversible hyperpolarizations associated with a complete suppression of the spiking activity (Fig. 5C and Fig. 5D).

Next, we investigated the ability of those light pulses to suppress L2/3 sensory evoked responses in the barrel cortex. Electroporated mice were anesthetized and a small craniotomy was performed to expose the Arch-expressing barrel cortex. Then, tetrodes were inserted perpendicularly into the barrel cortex and lowered at depths between 200 μ m and 350 μ m, which correspond to L2/3. We confirmed the laminar depth of electrodes histologically (Fig 6B). The multi-unit spike activity (MUA) from small populations of L2/3 neurons was monitored by band-pass filtering (0.6–6 kHz) the raw signal. The example in Fig. 6C shows an example of band-pass filtered traces simultaneously recorded from the four wires in a tetrode. Individual units were clustered manually from tetrode recordings by defining boundaries in waveform feature spaces (an example is shown in Fig. 6D and E). Somatosensory stimulations were elicited by mechanically deflecting the principal whisker (PW) in the rostro-caudal direction with 1-second cosine waves at 30 Hz. The fidelity of the stimulation device was measured with photodiodes. Except for a slight ringing at the offset of the stimulation, we did not observe any alteration in the stimulus waveform or amplitude (Fig. 6A; bottom trace).

We recorded L2/3 spiking activity of putative single units during tactile stimulations presented either alone (control condition) or paired with green light pulses (photo-suppression condition). We quantified the sensory evoked responses as the mean firing rate across the entire stimulus duration.

As illustrated for the example recording in Fig. 6F, the peri-stimulus raster plot showed a sharp increase in firing rate after stimulus onset followed by an adapting firing rate for the duration of the stimulus in both conditions. However, the magnitude of the evoked response was lower when sensory stimulations were paired with green light pulses. To examine the degree to which the optogenetic approach was effective at suppressing L2/3 sensory evoked

responses, we compared the firing rate when the PW was stimulated alone versus the firing rate when the stimulation of the PW was paired with green light pulses (Fig. 6G). On a unit-by-unit basis, 61% of L2/3 units exhibited a significant reduction in mean firing rate during illumination ($P < 0.05$, Wilcoxon sum-rank test; $n=22$ out of 36 units from 4 animals). The average reduction was $35.7 \pm 3.6\%$, demonstrating the effectiveness of our optogenetic approach. The remaining units showed no significant change ($P > 0.05$, Wilcoxon sum-rank test), reflecting incomplete transfection of the Arch. Therefore, with this experimental system, we could reliably and specifically test the functional effect of modulating L2/3 neuronal activity on the sensory processing operated by deep layer neurons.

L2/3 pyramidal neurons activity amplifies sensory evoked responses in L5 neurons.

We next focused on the impact of decreasing the drive of L2/3 input on the sensory responses evoked in L5 (Fig. 7). 72% of L5 units exhibited a significant light-induced decrease in firing rate during sensory stimulation. ($P < 0.05$, Wilcoxon sum-rank test; $n=36$ out of 50 units from 10 animals; Fig. 7F). On average, the magnitude of the suppression was $30.2 \pm 2.2\%$. The suppression effect was not due to direct LED illumination of the retina or the cortex, as it was absent in unelectroporated animals ($P < 0.05$, Wilcoxon sum-rank test; $n = 37$ units from 4 animals; Fig. 7G).

Anesthesia may change the impact of L2/3 pyramidal neurons on cortical responses to sensory stimuli in L5 neurons. To address this issue, we optogenetically suppressed sensory evoked activity in L2/3 pyramidal neurons in awake animals and determined the resulting effect on deep layer neurons. Mice were head-fixed and habituated to running on a free-spinning circular treadmill. In this condition, 55% of L5 units exhibited a significant light-induced decrease in firing rate during sensory stimulation. ($P < 0.05$, Wilcoxon sum-rank test; $n=22$ out of 40 units from 4 animals; Fig. 7H). On average, the magnitude of the suppression was $27.4 \pm 2.8\%$, which is slightly lower to what we observed in anesthetized animals. However, this difference was not statistically significant ($P > 0.37$, Wilcoxon sum-rank test).

L5 neurons represent a heterogeneous population. It is composed of regular spiking (RS), intrinsically bursting (IB) and fast spiking neurons (FS) (Steriade, 2004). RS and IB neurons largely representing excitatory neurons, while FS neurons primarily corresponding to inhibitory neurons (although a subset of FS neurons may correspond to FS excitatory neurons). As the suppression effect might be specific of one of these populations, we tried to classify the units based on three main parameters that characterize the shape of extracellularly

recorded action potentials: the ratio between the amplitudes of the peak and the trough, the peak to trough time and the rise of the ending slope (Fig. 8A and B) (Niell and Stryker, 2008; Welle and Contreras, 2015). However, in our recording conditions, this strategy failed to reliably separate FS from RS units. Nevertheless, plotting the magnitude of the suppression against the values of each of the measured parameters did not reveal any significant correlation (Fig. 8C).

The suppression effect could also be biased by very low or very high firing rates in L5 units during control sensory responses. Units with high control firing rates could show small response ratios even for important effects of decreasing L2/3 input. Conversely, units with low control firing rates could show very large suppression even for small effects of the light pulses. To verify whether such bias was present in our data, we plotted the magnitude of the suppression against control sensory evoked firing rates (Fig. 8D). However, we didn't observe any significant correlation in the distribution of data points (larger rates are not associated with low magnitude of suppression and vice-versa).

Taken together, these results demonstrate that L2/3 input plays a major role in amplifying sensory evoked spiking activity in L5 neurons.

Gain control of L5 sensory responses by L2/3 pyramidal neurons.

We hypothesized that L5 neurons sensitivity to increasing stimulus velocity should be affected by L2/3 input. We first investigated the response gain of L5 units to cosine stimulations of increasing velocity in control condition. Out of 36 units that had their sensory evoked responses significantly suppressed by light pulses in anesthetized mice, 13 units showed a consistent modulation of their firing rate as a function of the stimulus velocity and were therefore included in this analysis. A representative example of those neurons is shown in Fig. 9A. In control condition, the relationship between the evoked spiking activity and the velocity of the stimulation showed saturation and was well fitted by a sigmoidal function (Fig. 9B; black curve). When decreasing L2/3 input with light pulses, this relation was also well fitted by a sigmoidal function. Furthermore, the suppression in response magnitude was stimulus dependent; that is, it became larger at increasing stimulus velocity (Fig. 9B; green curve). The transformation between the spiking activity in control and photo-suppression conditions was better achieved by a divisive scaling model (blue dashed curve) than a subtractive model (yellow dashed curve), suggesting a gain change.

At the population level, for the 8 units that showed saturation in the stimulus response function in control condition, we found that light pulses significantly decreased the R_{max} of the sigmoidal fit ($P=0.008$; paired Wilcoxon signed-rank test; Fig. 9C) without affecting half-saturation stimulus velocity ($P=0.2$; paired Wilcoxon signed-rank test; Fig. 9D). This result is also consistent with a gain change, such that the effect of L2/3 input scales multiplicatively with the stimulus velocity.

Since saturation of the mean firing rate as a function of stimulus velocity did not occur in all units, we performed a second analysis. For each unit, we compared the firing rate when the PW was stimulated alone versus the firing rate when the stimulation of the PW was coupled with green light pulses regardless of stimulus velocity (Fig. 9E). We found that the impact of light pulses led to a decrease in the spike rate of L5 units that was well described by a linear transformation (0.65 control rate, minus an offset of 0.14 spikes/s; $n=13$ units). Again, this stereotyped change further indicates a multiplicative scaling effect of L2/3 input on L5 sensory responses.

Discussion:

Using cell-type specific and reversible optogenetic manipulations in the somatosensory cortex of anesthetized and awake mice, we show for the first time that L2/3 pyramidal neurons play a major role in amplifying sensory evoked responses in L5 neurons. Furthermore, the effect of L2/3 input scales with the velocity of the somatosensory stimulus. This scaling indicates that L2/3 pyramidal neurons implement a gain control in deep layer neurons (Atallah et al., 2012; Olsen et al., 2012; Wilson et al., 2012).

Given the fact that our perturbation of L2/3 pyramidal neurons was moderate (35% of suppression on average), and thus fall within the range of changes in firing rates spanned by these neurons during awake-behaving states in mice (Niell and Stryker, 2010; Polack et al., 2013), we believe that these neurons are likely to exhibit a similar level of control over sensory evoked responses in L5 neurons during naturally occurring behavioral states.

Gain modulation is a fundamental cortical operation that is crucially involved in sensory representation and sensorimotor integration. For example, visual responses in the posterior parietal cortex are gain modulated by gaze direction (Andersen and Mountcastle, 1983). Such enhancement of the gain of neuronal responses by focused spatial attention has been reported

to improve the orientation discriminability of cortical neurons the visual system (McAdams and Maunsell, 1999). In addition to this regulatory effect, neuronal response gain for one sensory parameter can be modulated by changes in another parameter. In primary visual cortex, contrast gain modulation allows receptive field properties and orientation selectivity to remain constant, regardless of contrast-dependent changes in the overall magnitude of neuronal responses (Ferster and Miller, 2000; Carandini and Heeger, 2012).

Importantly, L2/3 activity is not only driven by L4 input but also modulated by cortical feedback from other areas, such as secondary somatosensory cortex or primary motor cortex (Feldmeyer et al., 2013; Zaghera et al., 2013). Therefore, L2/3 neurons might represent a key node for dynamically tuning stimulus representations of the cortical output layer in different brain states or under different behavioral demands.

How might L2/3 pyramidal neurons control the gain of L5 neurons in a multiplicative manner? Although, various combinations of changes in membrane potential, membrane conductance, and membrane potential variance can be utilized to result in changes in the slope of the input-output function of a target neuron, our *in vitro* intracellular recordings indicate that the major mechanism by which L2/3 neurons influence L5 neurons is through the generation of excitatory post-synaptic potentials irrespectively of their activity patterns (Fig. 3 and 4).

In the absence of significant levels of membrane potential variance as it occurs *in vitro*, tonic depolarization increases neuronal responsiveness only by shifting input-output curves leftward along the input axis and, therefore, does not result in a multiplicative scaling of the gain curve. However, *in vivo*, neurons are embedded in constantly active networks and receive a continuous stream of synaptic input that induces large membrane potential fluctuations (Steriade, 2001; Destexhe et al., 2003). As a consequence, in any given cortical neuron, the average frequency of firing as a function of the membrane potential depolarization evoked by synaptically driven sensory stimulations follows a power law function (Anderson et al., 2000; Priebe and Ferster, 2012).

Such a relationship between membrane potential and firing rate has broad and important implications for how any changes in membrane potential affect the gain of the sensory evoked responses in cortical neurons (Haider and McCormick, 2009). Indeed, modeling and experimental studies indicate that in such condition, a depolarization of cortical neurons by a few millivolts, as it occurs with barrages of synaptic potentials evoked by L2/3 input, results in only a small increase at the lower end of the membrane potential-firing rate relationship but

a much larger increase in the firing rate at the high end of this relationship (Murphy and Miller, 2003; Cardin et al., 2008). Therefore, in the presence of moderate to high variance in membrane potential fluctuations as it occurs *in vivo*, a simple depolarization can induce a multiplicative gain modulation to sensory stimuli.

Since we were not able to achieve a complete suppression of sensory evoked responses in L2/3 neurons with our optogenetic approach, it is of utmost importance to highlight that our result cannot be viewed as a support for the canonical circuit model proposed by Gilbert and Wiesel (Gilbert and WIESEL, 1979). The suppression effect we observed in L5 neurons is relatively modest (27% on average in awake animals), therefore, we cannot rule out a major contribution of thalamic input in driving sensory evoked activity in L5 neurons (Constantinople and Bruno, 2013).

A growing number of recent studies point toward the existence of alternative translaminar circuits, which have a major contribution in modulating the cortical output (Bortone et al., 2014; Kim et al., 2014; Pluta et al., 2015). In line with these studies, our results further indicate that sensory processing in any given layer may be modulated by activity in other layers through vertical excitatory axons (Olsen et al., 2012).

Our finding might seem inconsistent with a recent study indicating that pharmacological inactivation of L2/3 activity has no impact on the magnitude of sensory evoked responses in L5 neurons in the rat barrel cortex (Constantinople and Bruno, 2013). However, it is important to note that the amplification effect of L5 sensory responses by L2/3 activity we describe might have been missed owing to the use of sensory stimuli of a different nature. While the previous work studied the cortical responses to transient ramp and hold stimulations of relatively low velocity, we used sustained vibro-tactile stimuli of relatively high frequency.

L2/3 spiking activity in the barrel cortex has been reported to be sparse in response to ramp and hold stimuli (Wilent and Contreras, 2004; de Kock et al., 2007), however our results indicate that L2/3 units can fire for sustained periods at moderately high rates (5 to 10 Hz or more) when presented with high velocity sustained vibrotactile stimulations. Furthermore, our *in vitro* intracellular recordings demonstrate that the modulation L5 neurons excitability by L2/3 pyramidal neurons is activity dependent. Indeed, the excitatory influence of L2/3 pyramidal neuron on L5 neurons increases with the stimulation frequency (Fig. 3 and 4).

Rodents use sensory input from their whiskers for navigating the environment, social interactions, as well as object localization and discrimination (Diamond and Arabzadeh, 2013). When rodents use their whiskers to localize objects, the whiskers are swept

rhythmically forth and back at frequencies ranging from 1 to 20 Hz (Diamond et al., 2008; O'Connor et al., 2013) and each contact elicits a transient response in barrel cortex neurons (Gutnisky et al., 2016). However during texture discrimination tasks, whiskers display high frequency (25 to 200 Hz) micro-motions as they are swept across smooth or rough textures (Ritt et al., 2008). Such vibratory activity evokes sustained responses in barrel cortex neurons (Andermann et al., 2004). Therefore, it is possible that the involvement of L2/3 neurons in shaping the sensory responses of L5 neurons would be much more pronounced during texture discrimination compared to object localization tasks. Future experiments in behaving animals should address the task-dependency of the recruitment of the translaminar connectivity and how it affects sensory perception (Chen et al., 2013).

The optogenetic manipulations we describe in the present work provide a basis for ‘functional connectomics’ in active cortical circuits, and also reveal the computational role of a specific layer *in vivo* during sensory processing. In bridging the gap between cellular and network function, this approach should be applicable to other layers and cortical areas, to elucidate their functional connectivity and embodied computational principles.

Bibliography:

- Adesnik H, Scanziani M (2010) Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464:1155–1160.
- Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M (2012) Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73:159–170.
- Bureau I, Saint Paul von F, Svoboda K (2006) Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* 4:e382.
- Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE, Boyden ES (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463:98–102.
- Constantinople CM, Bruno RM (2011) Effects and Mechanisms of Wakefulness on Local Cortical Networks. *Neuron* 69:1061–1068.
- Constantinople CM, Bruno RM (2013) Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science* 340:1591–1594.
- Crandall SR, Cruikshank SJ, Connors BW (2015) A Corticothalamic Switch: Controlling the Thalamus with Dynamic Synapses. *Neuron* 86:768–782.

- Diamond ME, Heimendahl Von M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E (2008) 'Where' and "what" in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9:601–612.
- Douglas RJ, Martin KAC (2004) Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* 27:419–451 Available at:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217339%5Cnhttp://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152>.
- Douglas RJ, Martin KAC (2007) Mapping the matrix: the ways of neocortex. *Neuron* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964242>.
- Gilbert CD, WIESEL TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120–125 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/552600>.
- Haider B, Häusser M, Carandini M (2013) Inhibition dominates sensory responses in the awake cortex. *Nature* 493:97–100 Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3537822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Harris KD, Shepherd GMG (2015) The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci* 18:170–181.
- Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D (2009) Neuronal correlates of local, lateral, and translaminar inhibition with reference to cortical columns. *Cereb Cortex* 19:926–937.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* 26:448–457.
- Hooks BM, Hires SA, Zhang Y-X, Huber D, Petreanu L, Svoboda K, Shepherd GMG (2011) Laminar analysis of excitatory local circuits in vibrissal motor and sensory cortical areas. Petersen CCCH, ed. *PLoS Biol* 9:e1000572.
- Katz Y, Heiss JE, Lampl I (2006) Cross-whisker adaptation of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurosci* 26:13363–13372.
- Kätzel D, Zemelman BV, Buetfering C, Wölfel M, Miesenböck G (2011) The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells. *Nat Neurosci* 14:100–107.
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria J-C, Petersen CCCH (2009) The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61:301–316.
- Lottem E, Azouz R (2009) Mechanisms of tactile information transmission through whisker vibrations. *J Neurosci* 29:11686–11697.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13940–13945.
- Niell CM, Stryker MP (2008) Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci* 28:7520–7536.

- Niell CM, Stryker MP (2010) Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron* 65:472–479.
- Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M (2012) Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature* 483:47–52.
- Petreaanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K (2007) Channelrhodopsin-2–assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 10:663–668.
- Pluta S, Naka A, Veit J, Telian G, Yao L, Hakim R, Taylor D, Adesnik H (2015) A direct translaminal inhibitory circuit tunes cortical output. *Nat Neurosci* 18:1631–1640.
- Pouille F, Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 429:717–723.
- Ranjbar-Slamloo Y, Arabzadeh E (2017) High-velocity stimulation evokes “dense” population response in layer 2/3 vibrissal cortex. *J Neurophysiol* 117:1218–1228.
- Ritt JT, Andermann ML, Moore CI (2008) Embodied Information Processing: Vibrissa Mechanics and Texture Features Shape Micromotions in Actively Sensing Rats. *Neuron* 57:599–613.
- Saito T, Nakatsuji N (2001) Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental Biology* 240:237–246 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160601904397>.
- Shao YR, Isett BR, Miyashita T, Chung J, Pourzia O, Gasperini RJ, Feldman DE (2013) Plasticity of recurrent I2/3 inhibition and gamma oscillations by whisker experience. *Neuron* 80:210–222.
- Steriade M (2004) Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5:121–134.
- Welle CG, Contreras D (2015) Sensory-driven and spontaneous gamma oscillations engage distinct cortical circuitry. *J Neurophysiol*:jn.00137.2015.
- Wilent WB, Contreras D (2005) Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 8:1364–1370.
- Wilson NR, Runyan CA, Wang FL, Sur M (2012) Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* 488:343–348.
- Wimmer VC, Bruno RM, de Kock CPJ, Kuner T, Sakmann B (2010) Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex* 20:2265–2276.
- Wolfe J, Hill DN, Pahlavan S, Drew PJ, Kleinfeld D, Feldman DE (2008) Texture Coding in the Rat Whisker System: Slip-Stick Versus Differential Resonance. *PLoS Biol* 6:e215.
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 17:205–242.

Legends:

Figure 1. ChR2 Expression in L2/3 Pyramidal Neurons following *in utero* electroporation.

A. Left panel: GFP fluorescence in a whole-brain of anelectroporated mouse. Arrows indicate S1 (left) and callosal projections (right). Middle panel: GFP fluorescence in a coronal slice through the barrel cortex of an electroporated hemisphere showing somatodendritic labeling in L2/3 and axonal branches in L2/3 and L5. Expression is shown in a P30 animal. Right panel: labeled L2/3 pyramidal neurons.

B. Double immunostaining for ChR2-EYFP and the neuronal marker Neu-N.

Figure 2. Photostimulation of ChR2-positive neocortical L2/3 pyramidal neurons.

A. High-resolution image showing the biocytin labeling (orange) of an individual L2/3 GFP-positive pyramidal neuron. Scale bar: 50 μm .

B. Regular spiking adapting firing pattern in response to a current pulse for the neuron shown in A.

C. Whole-cell voltage-clamp recording from a ChR2-positive L2/3 neuron. Light stimuli (2-ms duration) are indicated by blue ticks at top.

D. Whole-cell current-clamp recording of the same neuron shown in C, revealing its spiking activity in response to the light pulses.

E. Average firing probability in response to light pulses of different frequencies as a function of the pulse number for the population of recorded GFP-positive L2/3 neurons (n=8). Pulse numbers are on the x-axis; stimulation frequency is on the y-axis. Firing probability is color coded on a linear scale.

Figure 3. Frequency dependence of L2/3 pyramidal neurons stimulations in modulating the excitability of L5 pyramidal neurons.

A. High-resolution image showing the biocytin labeling (red) of an individual L5 pyramidal neuron. Scale bar: 50 μm .

B. Regular spiking adapting firing pattern in response to a current pulse for the neuron shown

in A.

C. Examples of EPSCs (blue traces) and IPSCs (red traces) evoked in a L5 pyramidal neuron by the photostimulation of L2/3 pyramidal neurons.

D. Plots of average excitatory (blue curve) and inhibitory (red curve) charges evoked in L5 pyramidal neurons as a function of the photostimulation frequency of L2/3 pyramidal neurons (n=19 neurons). Error bars correspond to +/- SEM.

E. Examples of evoked spiking activity in a L5 pyramidal neuron in response to the photostimulation of L2/3 pyramidal neurons.

F. Plots of the average mean firing rates evoked in L5 pyramidal neurons as a function of the photostimulation frequency of L2/3 pyramidal neurons (n=19 neurons). Error bars correspond to +/- SEM.

Figure 4. Frequency dependence of L2/3 pyramidal neurons stimulations in modulating the excitability of L5 fast-spiking neurons.

A. High-resolution image showing the biocytin labeling (red) of an individual L5 non-pyramidal neuron. The arrow on the left image points toward the biocytin filled neuron. Right image represents an enlargement of the left one. Scale bar: 50 μ m.

B. Fast-spiking non-adapting firing pattern in response to a current pulse for the neuron shown in A.

C. Examples of evoked spiking activity in a L5 fast-spiking neuron in response to the photostimulation of L2/3 pyramidal neurons.

D. Plots of the average mean firing rates evoked in L5 fast-spiking neurons as a function of the photostimulation frequency of L2/3 pyramidal neurons (n=9 neurons). Error bars correspond to +/- SEM.

Figure 5. Photo-inhibition of Arch-positive neocortical L2/3 pyramidal neurons.

A. High-resolution image showing the biocytin labeling (orange) of an individual L2/3 GFP-positive pyramidal neuron. Scale bar: 50 μ m.

B. Regular spiking adapting firing pattern in response to a current pulse for the neuron shown in A.

C. Overlay of membrane potential fluctuations in response to a 1-second green light pulse when the neuron shown in A was held at depolarized membrane potentials (10 trials). Horizontal bar indicates light pulse presentation.

D. Firing rates: before, during and after 1-second green light pulses for each of the recorded GFP-positive neurons (n=8). Each neuron was held at depolarized membrane potentials before the occurrence of the light pulses.

Figure 6. Photo-suppression of sensory evoked spiking activity in L2/3 of mice electroporated with Arch plasmid.

A. Schema of the experimental paradigm. Recordings were made in the barrel cortex while stimulating the principal whisker of the recorded units using a piezo-electric device. Top traces represent the stimulus waveform, as measured with photodiodes. Bottom traces represent cutouts of the onset and offset of the stimulus waveform.

B. Example imaging of a DiI track of a recording electrode inserted into the barrel cortex. Green: Arch-GFP, red: DiI.

C. Band-pass filtered (0.6–6 kHz) signal from the four wires of a tetrode to obtain the local spiking activity.

D. Example of a tetrode recording where one unit was isolated. The scatter plots represent the peak amplitudes of spikes (threshold at 0.5 mV) on two channels of a tetrode. Left panel: plot of unsorted spikes for the whole recording duration. Middle panel: same plot after assignment of spikes to a given unit (unassigned spikes are in black). The average waveform from each of the recording sites for the sorted unit is shown in the right panel.

E. Inter-spike-intervals histograms (ISI) of the clustered unit showing refractory periods. Red line indicates 1 msec ISI.

F. Peri-stimulus raster plots of a representative L2/3 unit to a 1-second long 30 Hz whisker stimulations presented either alone (left panel) or paired with green light pulses (right panel). Horizontal bars indicate stimulus presentation.

G. Plot of the evoked mean firing rates when the sensory stimuli were paired with light pulses versus control conditions.

Figure 7. Modulation of sensory responses in L5 units by photo-suppression of L2/3 spiking activity.

A. Schema of the experimental paradigm. Recordings were made in the barrel cortex while stimulating the principal whisker of the recorded units using a piezo-electric device. Top traces represent the stimulus waveform, as measured with photodiodes. Bottom traces represent cutouts of the onset and offset of the stimulus waveform.

B. Example imaging of a DiI track of a recording electrode inserted into the barrel cortex. Green: Arch-GFP, red: DiI.

C. Band-pass filtered (0.6–6 kHz) signals from the four wires of a tetrode to obtain the local spiking activity.

D. Example of a tetrode recording where one unit was isolated. The scatter plot represents the energy of spikes (threshold at 0.5 mV) on two channels of a tetrode. Assigned spikes to one unit are in purple (unassigned spikes are in black). The average waveform from each of the recording sites for the sorted unit is shown in the right panel.

E. Inter-spike-intervals histograms (ISI) of the clustered unit showing refractory periods. Red line indicates 1 msec.

F. G. and H. Peri-stimulus raster plots of representative L5 units to a 1-second long 30 Hz whisker stimulations presented either alone (left panel) or paired with green light pulses (middle panel). Horizontal bars indicate stimulus presentation. The right panels show the plots of the evoked mean firing rates when the sensory stimuli were paired with light pulses versus control conditions.

Figure 8. Relationships between the strength of the modulation of sensory responses in L5 units and their spike waveform parameters.

A. Average of the spike waveform for a representative unit.

B. Scatter plots of spike waveform parameters for all recorded L5 units in electroporated mice (n=90). Peak to trough ratio corresponds to the parameter x divided by the parameter y . Peak to trough time corresponds to the parameter t . Ending slope corresponds to the parameter z .

C. Magnitude of photo-induced suppression of sensory evoked responses in L5 units versus the values of each of the spike waveform parameters.

D. Magnitude of photo-induced suppression of sensory evoked responses in L5 units versus

their evoked mean firing rate in control condition.

Figure 9. Gain modulation of 5 sensory responses by L2/3 photo-suppression.

A. Peri-stimulus raster plots illustrate the spiking response of a representative L5 unit to repeated 1-second long 30 Hz whisker stimulations of increasing velocity. Top rasters (in black) correspond to the control condition. Bottom rasters (green) correspond to the condition where sensory stimuli were paired with green light pulses. Horizontal bars indicate stimulus presentation.

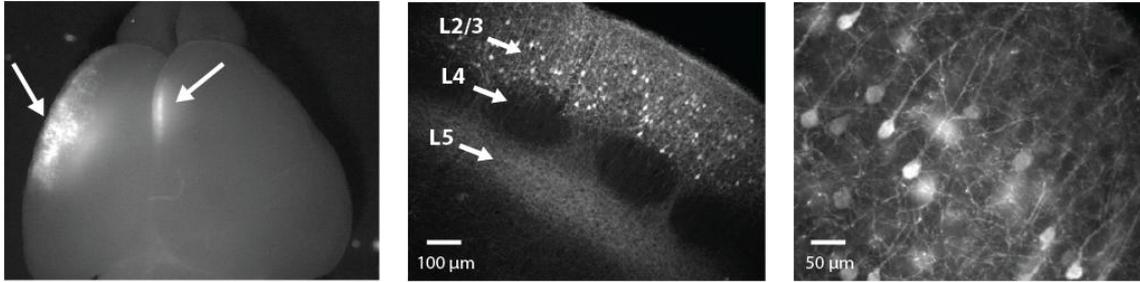
B. Evoked mean firing rate as a function of the stimulus velocity for the unit shown in A. Black curve corresponds to the sigmoidal fit in control condition and the green one corresponds to the sigmoidal fit when sensory stimuli were paired with light pulses. Error bars are the SEM. Blue dashed curve was obtained by dividing the control curve by a constant to match the R_{max} of the control condition curve. Yellow dashed curve was obtained by subtracting the control curve by a constant to match the R_{max} of the control condition.

C. Effects L2/3 suppression on the R_{max} of the sigmoidal fit of the evoked firing rates as a function of the stimulus velocity. Black lines indicate the evolution of R_{max} for individual units ($n=8$). Red lines correspond to the mean values. Raw R_{max} values are shown on the left panel and normalized values are shown on the right one. **: $P < 0.01$.

D. Effects L2/3 suppression on the $C50$ of the sigmoidal fit of the evoked firing rates as a function of the stimulus velocity. Black lines indicate the evolution of $C50$ for individual units ($n=8$). Red lines correspond to the mean values. Raw $C50$ values are shown on the left panel and normalized values are shown on the right one. NS: not significant.

E. Sensory evoked spike rates in L5 units under control conditions versus during L2/3 photo suppression (circles; 6 different velocities for each unit; $n=13$ units). Gray lines: linear fits for each unit; red line: average linear fit.

A



B

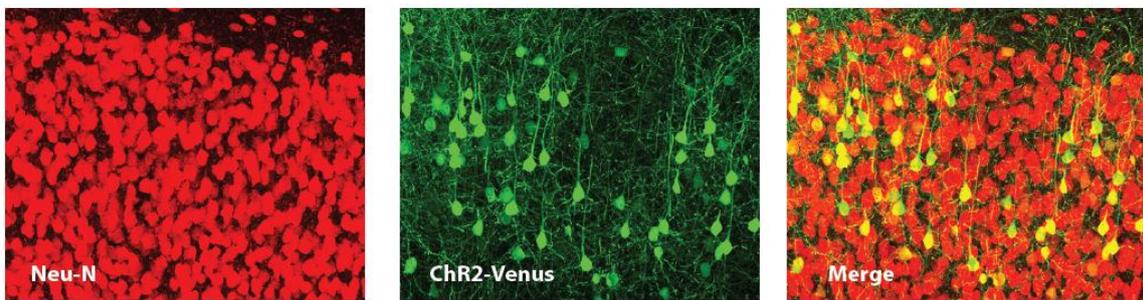


Figure 1

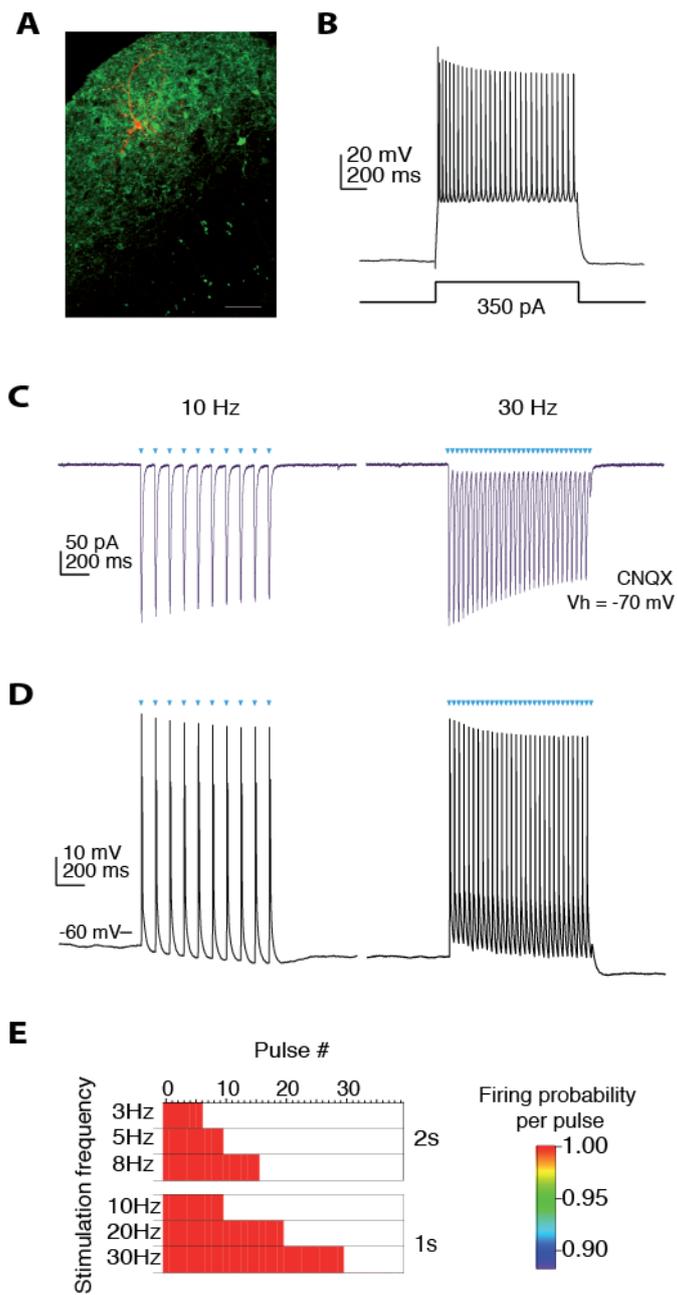


Figure 2

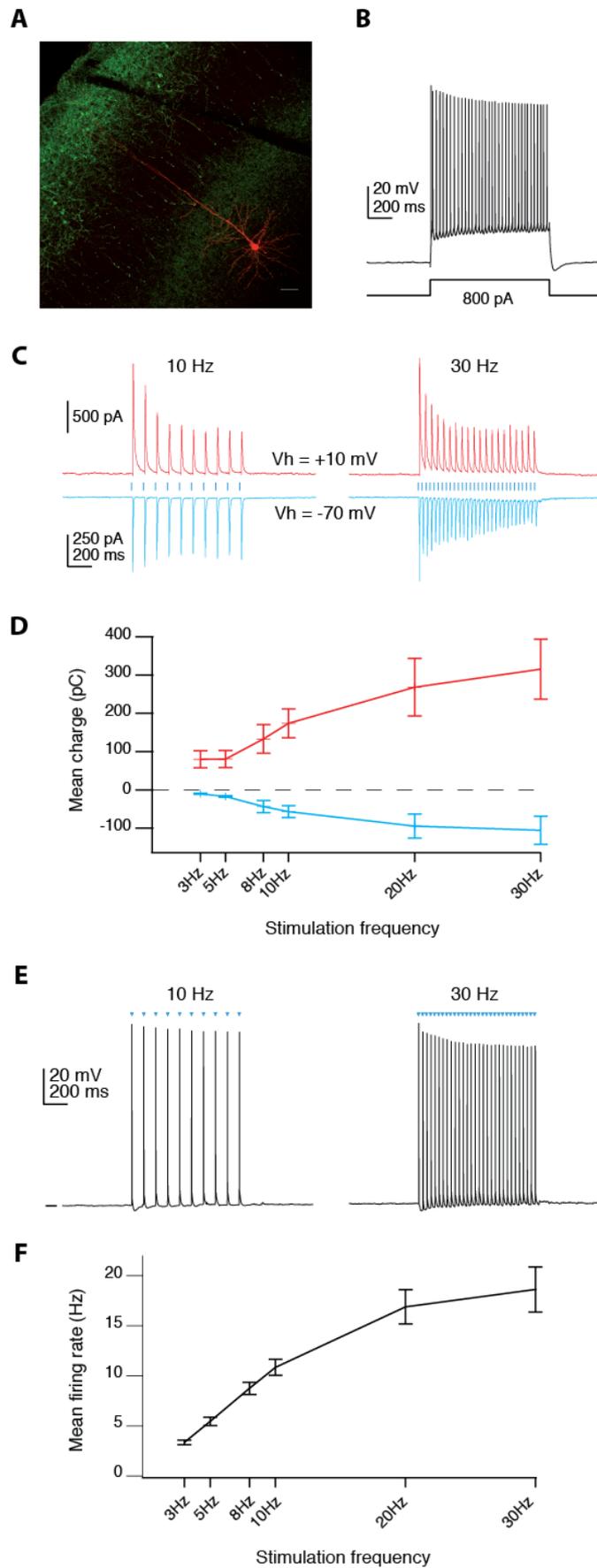


Figure 3

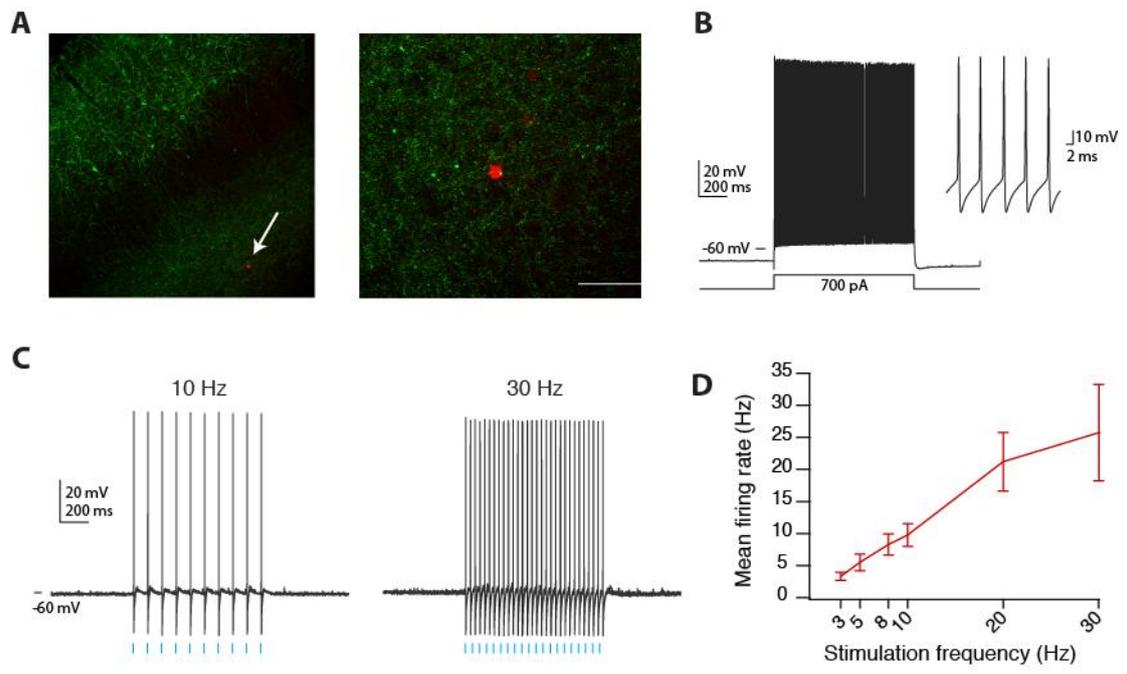


Figure 4

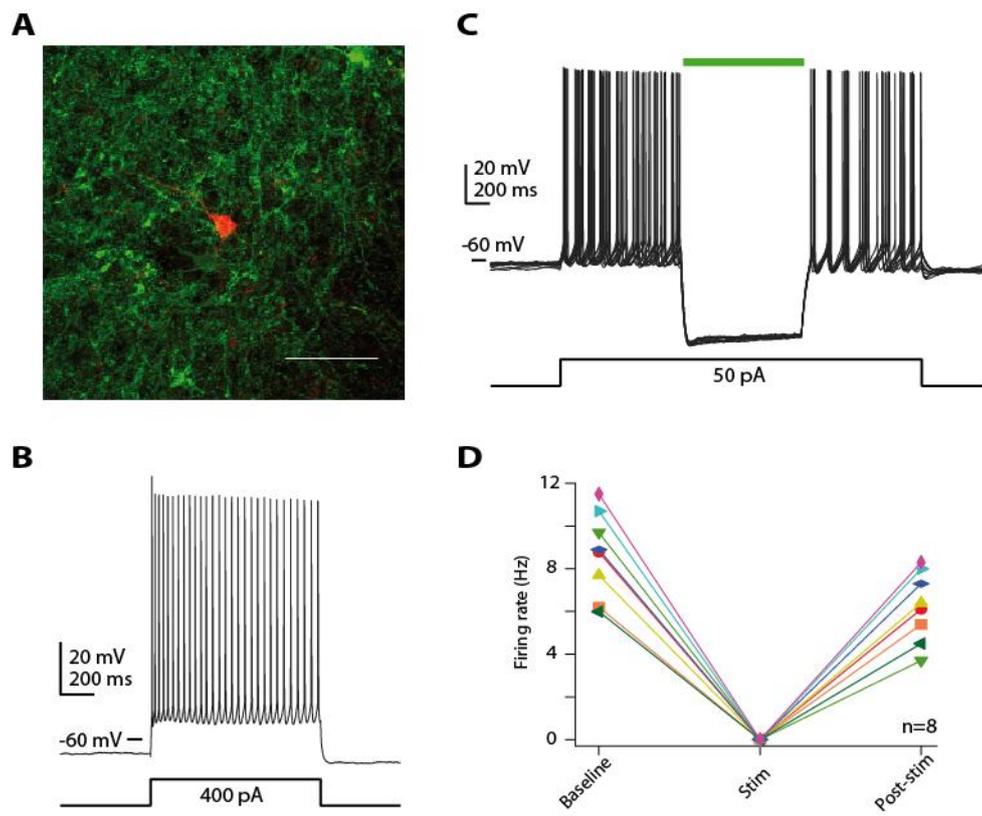


Figure 5

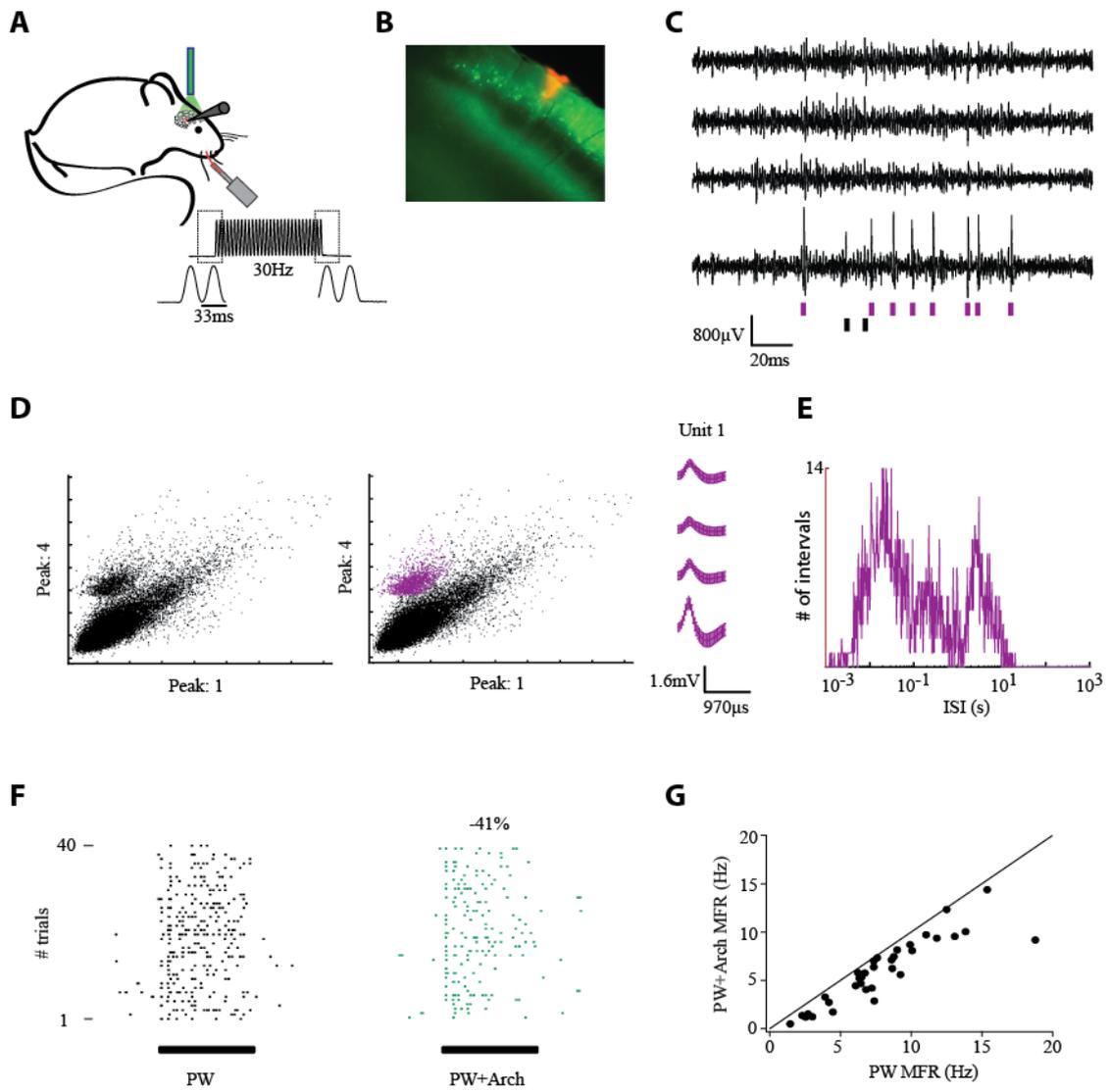


Figure 6

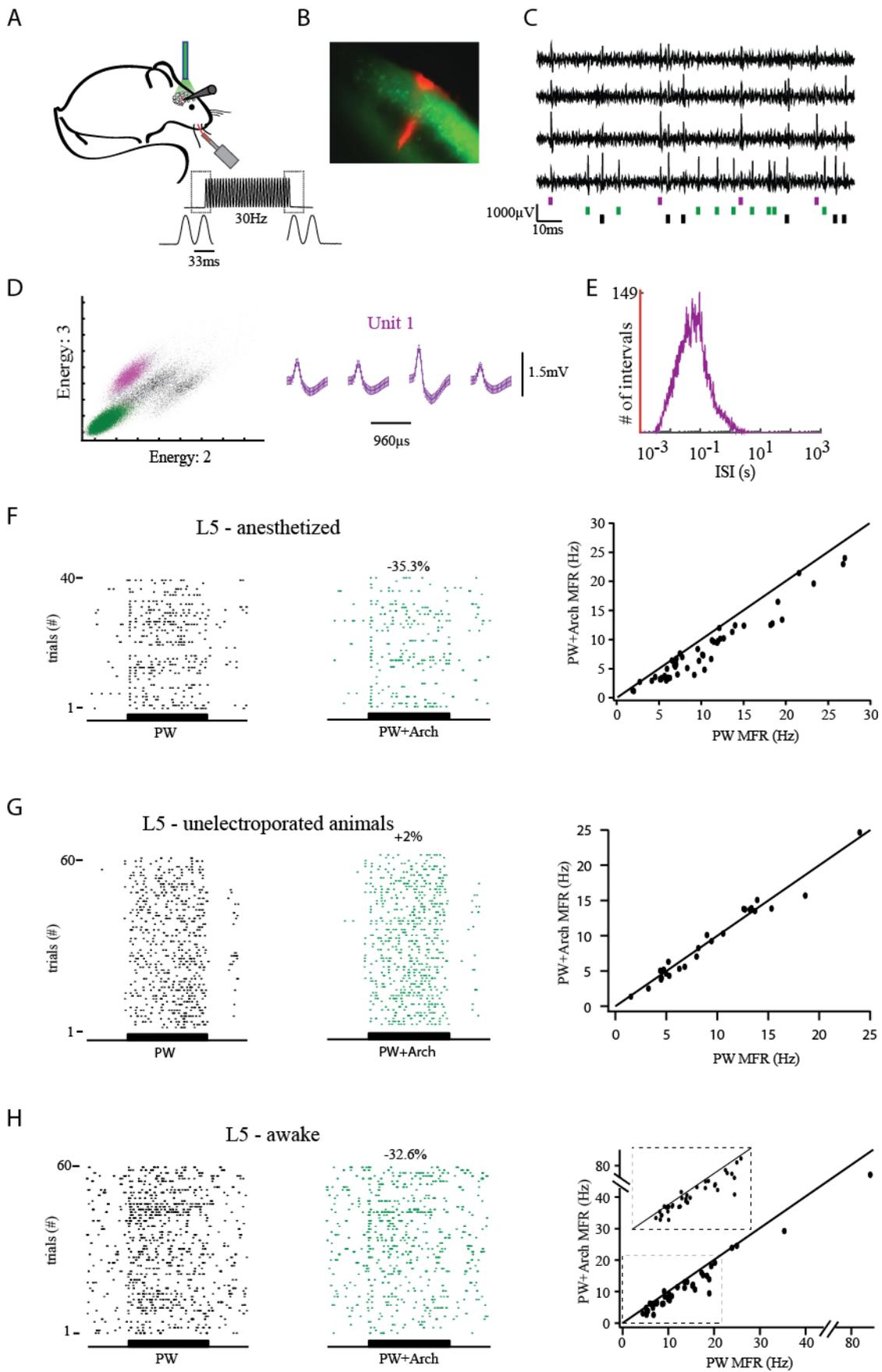


Figure 7

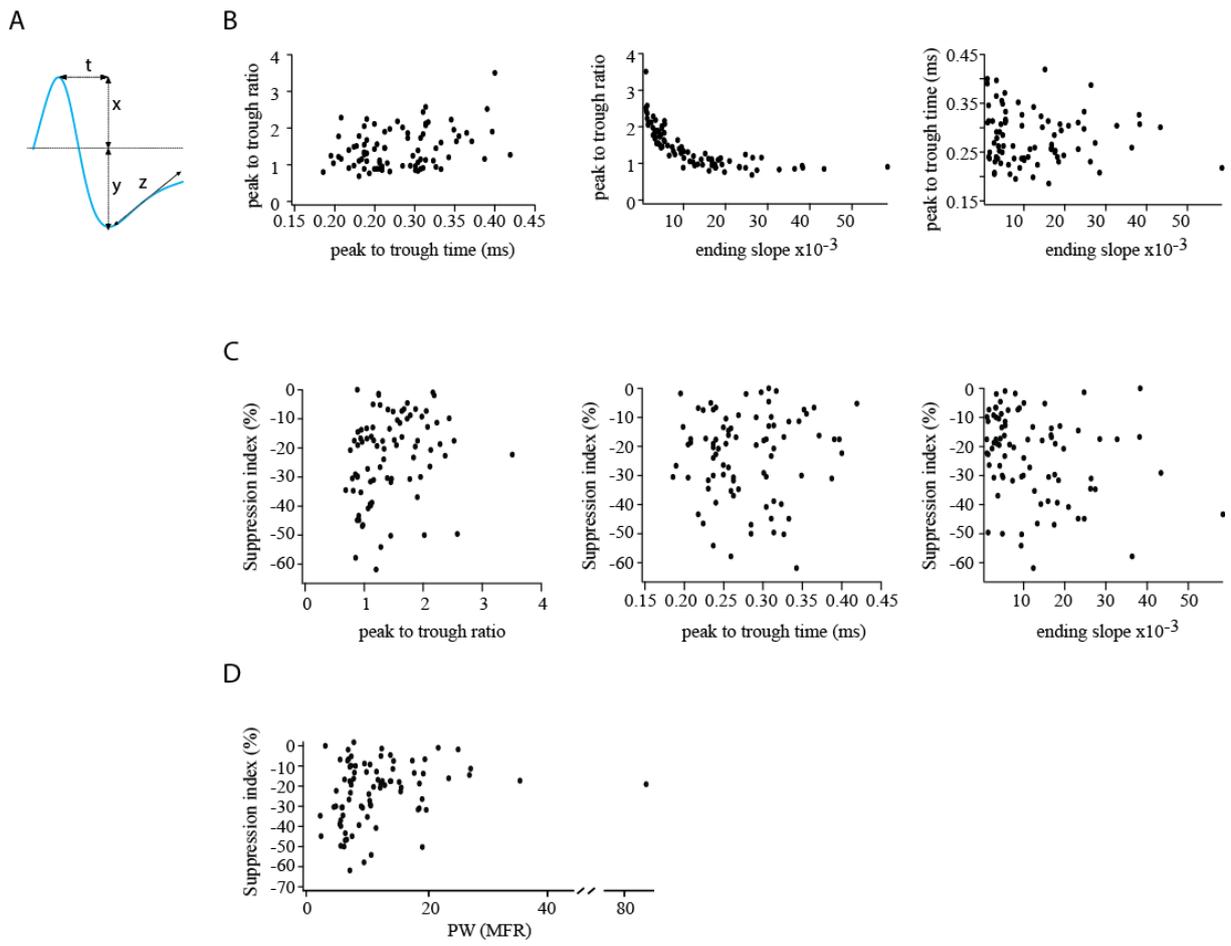


Figure 8

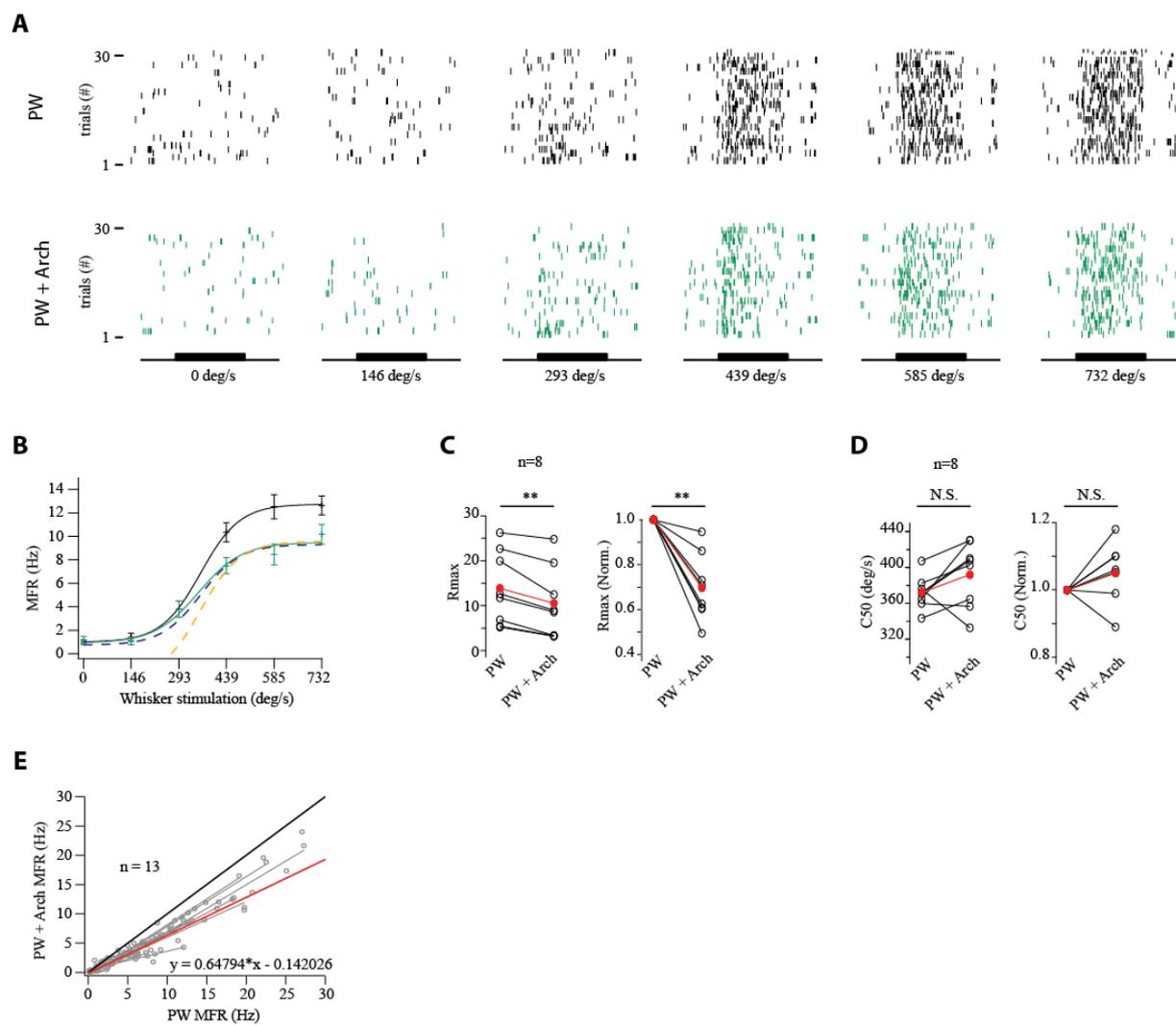


Figure 9

E. Discussion générale

Mon travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une étude pionnière visant à déterminer la possible implication fonctionnelle de la connectivité entre les neurones pyramidaux des couches 2/3 et les neurones des couches profondes (essentiellement couche 5), au cours de l'intégration des informations sensorielles en provenance des vibrisses.

Nous avons d'abord caractérisé cette connectivité par des enregistrements intracellulaires des neurones de la couche 5 *in vitro*, en activant spécifiquement les neurones pyramidaux des couches 2/3 qui exprimaient la ChR2. A l'instar de ce qui avait été démontré auparavant (Adesnik and Scanziani, 2010), nous avons observé que le recrutement des afférences excitatrices en provenance des couches 2/3 évoquait des courants à la fois excitateurs et inhibiteurs dans les neurones pyramidaux des couches profondes. Cette activation des afférences excitatrices avait pour effet d'évoquer une réponse des neurones de la couche 5 par des trains de potentiels d'action. Ainsi, malgré la présence de conductances à la fois excitatrices et inhibitrices la résultante nette de la photo-activation des couches 2/3 est une excitation des neurones de la couche 5. Bien que ce résultat ne soit pas nouveau, nous avons tout de même généralisé ce qu'Adesnik & Scanziani avaient décrit dans des conditions expérimentales similaires. En effet, dans leur contexte ils utilisaient des photo-stimulations sous la forme de rampes de lumière d'intensités croissantes. Il en résultait une synchronisation autoentretenu de l'activité des neurones des couches 2/3 dans la gamme de fréquence Gamma (aux alentours de 30 Hz), qui avait pour effet d'activer les neurones de la couche 5 de manière supraliminaire. Nous avons étendu ce résultat à une plus large gamme de fréquence, puisque nous avons établi une relation proportionnelle entre la fréquence de photo-stimulation (qui allait de 3 à 30 Hz) et la fréquence de décharge des neurones de la couche 5.

Très peu d'études conduites *in vivo* ont essayé d'évaluer le rôle de la connexion L2/3-L5 dans le traitement sensoriel. Dans la majorité des cas, les stratégies employées pour aborder cette problématique consistait en des lésions ou bien des inactivations pharmacologiques des neurones de la couche 4, ou du thalamus (Mignard, M ; Malpeli, 1991; Huang et al., 1998; Constantinople and Bruno, 2013). Ces principaux travaux suggèrent que les neurones de la couche 5 sont peu ou pas affectés par l'inhibition de la voie canonique (Thalamus-L4-L2/3) décrite initialement par Hubel & Wiesel, et proposent ainsi des circuits corticaux alternatifs qui seraient recrutés au cours des processus d'intégration sensorielle. Le désavantage majeur de ces études réside dans l'utilisation d'agents pharmacologiques, qui ne

permettent pas de contrôler spécifiquement (que ce soit pour activer ou inhiber) l'activité d'une sous-population de neurones. Typiquement, Constantinople & Bruno ont inhibé pharmacologiquement la couche 4 ce qui avait pour effet d'induire une disfacilitation des entrées excitatrices sensorielles dans les couches 2/3 (réductions des réponses sensorielles). Les auteurs n'ont pas observé de modifications significatives de l'amplitude des réponses sensorielles dans les neurones de la couche 5, concluant ainsi une déconnexion fonctionnelle entre les couches 2/3 et la couche 5 (Constantinople and Bruno, 2013). Or il a été montré que les neurones de la couche 4 pouvaient activer directement des interneurons inhibiteurs de la couche 5, indiquant ainsi l'existence d'une connexion interlaminaire inhibitrice directe L4-L5 (Pluta et al., 2015). Il n'est pas possible d'exclure un possible effet de compensation entre la réduction des entrées excitatrices en provenance des couches 2/3, et une réduction des entrées inhibitrices recrutées directement par la couche 4. L'originalité de mon travail de thèse a donc été de manipuler spécifiquement les neurones des couches 2/3 grâce à l'outil optogénétique, et d'étudier les effets de l'inhibition spécifique des neurones excitateurs des couches supragranulaires sur les réponses sensorielles de la couche 5. J'ai pu montrer pour la première fois que les couches 2/3 peuvent amplifier les réponses sensorielles des neurones de sortie du cortex, et donc une implication fonctionnelle de cette connexion canonique au cours du traitement sensorielle.

1. Mécanismes sous-jacents aux effets de la photo-suppression des neurones pyramidaux des couches 2/3 sur les réponses sensorielles des neurones des couches profondes

La photo-inhibition (Arch) des neurones excitateurs des couches 2/3 supprime une partie (30%) des réponses sensorielles dans la couche 5. Il est donc possible d'en déduire que les réponses sensorielles des neurones de la couche 5 qui reçoivent des entrées thalamiques directes, sont amplifiées par l'activité des neurones des couches 2/3. L'amplitude de la suppression est dépendante de l'amplitude des réponses sensorielles des neurones de la couche 5. En effet, le différentiel de réponse entre la condition contrôle et la condition avec photo-suppression des neurones des couches 2/3 augmente avec l'amplitude des réponses. Il y a donc une modulation multiplicative du gain des neurones de la couche 5 par les neurones pyramidaux des couches 2/3.

La modulation multiplicative du gain des réponses sensorielles des neurones infragranulaires par les neurones excitateurs des couches 2/3 pourrait s'expliquer par la modification de l'état de polarisation membranaire des neurones des couches profondes. En effet, des études théoriques et expérimentales suggèrent que l'ajout d'une conductance excitatrice ou bien la dépolarisation tonique, module son gain de manière multiplicative (**Figure 38**) (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Murphy and Miller, 2003; Haider et al., 2007). Ainsi l'augmentation de l'activité des neurones excitateurs des couches 2/3 pourrait dépolariser de manière tonique les neurones des couches profondes, induisant ainsi une modulation multiplicative du gain de leurs réponses sensorielles.

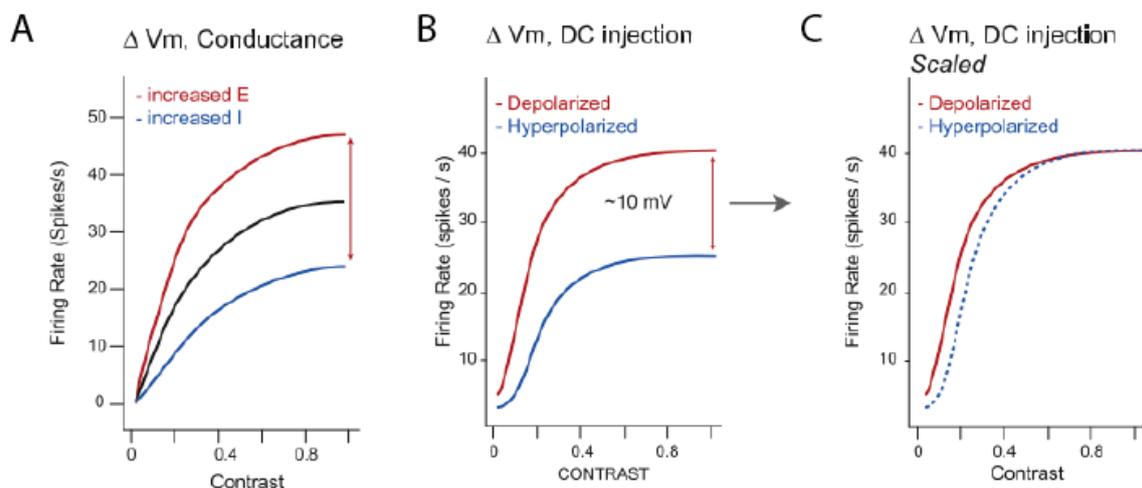


Figure 38 : Modulation du gain des neurones corticaux par des dépolarisations toniques ou par l'ajout de conductances. Adapté de [Haider & McCormick, 2009]

A) La modification des conductances excitatrices (en rouge) ou inhibitrices (en bleu) de fond entraîne une modulation multiplicative (ou divisive) du gain des réponses sensorielles des neurones corticaux en réponse à des stimuli visuels de contraste croissant.

B) De la même manière, l'injection intracellulaire de courant dépolarisant (en rouge) ou hyperpolarisant (en bleu) conduit également à des modulations multiplicatives ou divisives du gain des neurones corticaux.

C) Si l'on multiplie par un certain facteur la courbe bleue obtenue par l'injection de courant hyperpolarisant en B), on obtient la courbe bleue en pointillés qui ressemble fidèlement à celle obtenue par la dépolarisation tonique du neurone cortical. Le passage de la courbe bleue à la courbe rouge par la multiplication d'un certain facteur révèle le caractère multiplicatif de la modulation du gain décrite en B).

La suppression des réponses sensorielles a été observée lors de stimulations sensorielles soutenues à 30 Hz. Qu'en est-il des basses fréquences ? J'ai réalisé quelques expériences en procédant à des stimulations à 10 Hz de la vibrisse principale (données non présentées). Mes résultats préliminaires suggèrent que le phénomène de suppression est plus difficilement observable de manière significative, y compris pour des neurones supprimés à 30 Hz. Ceci peut s'expliquer par le fait que les réponses sensorielles s'adaptent moins à 10 Hz

qu'à 30 Hz. Puisque l'un des rôles des couches 2/3 est d'amplifier les réponses sensorielles des neurones de la couche 5, alors il est possible que cette amplification intervienne pour contrebalancer l'adaptation de la synapse thalamo-corticale dans la couche 5. Il serait intéressant de balayer un ensemble de fréquences de stimulations sensorielles et d'évaluer les possibles effets différentiels de la photo-suppression des couches 2/3 en fonction de la fréquence de stimulation de la vibrisse principale. Ceci permettrait entre autres de déterminer à partir de quelle fréquence (ou quel niveau d'adaptation) intervient potentiellement l'activité des neurones excitateurs des couches 2/3 pour amplifier les réponses sensorielles.

L'ensemble des résultats obtenus avec les expériences utilisant l'Archeorhodopsine suggère que la suppression de l'amplitude des réponses sensorielles des neurones des couches infragranulaires est sous-tendue par un mécanisme de disfacilitation des entrées excitatrices en provenance des couches 2/3. Pour résoudre de manière définitive la question du mécanisme de la suppression, il faudrait réaliser des enregistrements intracellulaires *in vivo* des neurones de la couche 5 dans les mêmes conditions expérimentales. L'injection intracellulaire de créneaux de courants hyperpolarisants en période contrôle (durant l'activité spontanée), pendant la réponse sensorielle seule et pendant la période de stimulation simultanée optogénétique et sensorielle permet de mesurer la résistance de membrane du neurone dans les différentes conditions. Lors de la suppression des réponses sensorielles, une augmentation de la résistance de membrane par rapport aux conditions contrôles (activité spontanée, et réponse sensorielle sans photo-stimulation) refléterait une diminution des conductances excitatrices, et donc une disfacilitation. À l'inverse, une diminution de la résistance membranaire indiquerait une augmentation de conductances, potentiellement inhibitrices.

Pour étendre ces résultats, il serait intéressant d'analyser les modifications conductances excitatrices et inhibitrices en injectant dans la pipette d'enregistrement extracellulaire du QX-314, qui inhibe les conductances cationiques voltage-dépendantes (essentiellement Na^+ , mais également K^+ et Ca^{2+}), et donc bloquer la genèse de potentiels d'action. Ceci permet de mesurer l'amplitude des potentiels synaptiques sous-limaires évoqués par la stimulation et ainsi d'estimer l'amplitude des conductances excitatrices et inhibitrices (Wilent and Contreras, 2005).

2. Impact des neurones des couches 2/3 sur les champs récepteurs des neurones des couches profondes

Il serait également intéressant de déterminer l'impact de la modulation de l'activité des couches 2/3 sur la taille des champs récepteurs des neurones des couches profondes en réalisant des stimulations de plusieurs vibrisses avec et sans la photo-suppression. Dans le cortex visuel de la souris les modulations multiplicatives du gain des réponses sensorielles ne sont pas associées à des modifications de la sélectivité à l'orientation (Wilson et al., 2012), ces résultats reposent sur la connectivité particulière entre les interneurons PV et les neurones pyramidaux (convergence des interneurons partageant la même orientation préférentielle, voir le dernier chapitre de l'introduction).

Etant donné que la taille des champs récepteurs des neurones des couches 2/3 est plus grande que celle des neurones thalamiques, il serait envisageable que la photo-suppression des neurones excitateurs des couches 2/3 puisse réduire la taille des champs récepteurs des neurones des couches profondes (**Figure 39**).

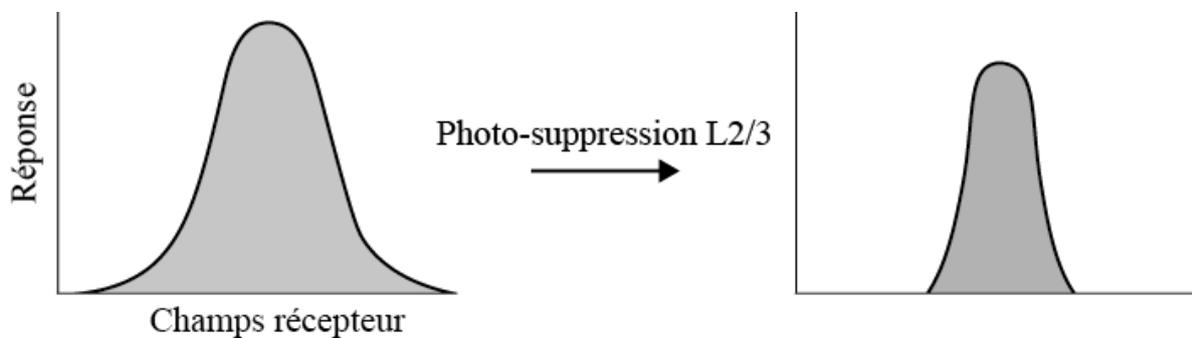


Figure 39 : Effet théorique de la photo-suppression des couches 2/3 sur la taille des champs récepteurs des neurones infragranulaires du cortex somesthésique.

3. Impact de la photo-suppression des neurones pyramidaux des couches 2/3 sur la perception sensorielle

La photo-suppression des couches 2/3 conduit à une diminution de 30% de l'amplitude des réponses sensorielles dans les couches profondes. En effet, en moyenne et à la vitesse maximale, les neurones de la couche 5 déchargent à 16 Hz en condition contrôle et à 12 Hz avec photo-suppression des neurones des couches 2/3. Savoir si la perte (ou à l'inverse l'ajout) de potentiels d'action impacte les capacités perceptuelles de l'animal au cours d'une tâche comportementale est une question majeure. L'incidence de cette diminution (ou augmentation) d'activité pourrait être extrêmement faible à l'échelle de plus larges réseaux de neurones. Cependant, il a été montré dans une étude conduite *in vivo* par injection intracellulaire de courant dépolarisant que l'ajout d'un unique potentiel d'action à l'activité spontanée d'un seul neurone, pouvait engendrer 28 potentiels d'action à l'échelle du réseau local (London et al., 2010). Par ailleurs, Huber et collaborateurs ont mesuré chez le rongeur engagé dans une tâche comportementale, le nombre de neurones actifs nécessaires et suffisants à évoquer une perception sensorielle consciente. Ces auteurs ont exprimé la ChR2 de manière spécifique dans les neurones excitateurs des couches 2/3 du barrel cortex de la souris, ce qui leur permettait de contrôler de manière fiable, temporellement précise et réversible l'activité de ces neurones. Ils ont appris à des souris à associer la photo-activation spécifique des neurones pyramidaux des couches 2/3 (5 créneaux de lumière d'une milliseconde, à 20 Hz) avec une prise de récompense (goutte d'eau) (Huber et al., 2008). En mesurant le nombre de cellules activées et en estimant la quantité moyenne de potentiels d'action émise par chaque cellule, Huber et collaborateurs ont suggéré que le recrutement de 60 neurones émettant 5 potentiels d'action est suffisant pour évoquer une perception consciente de la photo-stimulation. Ces résultats permettent d'imaginer que des modifications en apparence faibles de l'activité des neurones corticaux seraient suffisantes pour affecter les propriétés d'intégration sensorielle consciente de l'animal.

La modification du gain des réponses sensorielles des neurones des couches profondes lors de la manipulation optogénétique des neurones des couches 2/3 peut éventuellement impacter les capacités de l'animal à discriminer ou détecter des stimuli sensoriels. Si le rôle des neurones des couches 2/3 est d'amplifier le gain des réponses sensorielles dans les couches profondes, il est possible d'envisager une amélioration des capacités de l'animal à discriminer des stimuli tactiles dont les paramètres (par exemple la vitesse) sont proches,

comme décrite auparavant dans le cortex visuel (Mcadams and Maunsell, 1999). En effet, la variation des réponses sensorielles sera d'autant plus grande pour une faible variation des paramètres de stimulations si les couches 2/3 sont actives, par rapport à une condition où elles seraient moins recrutées. Toutefois, cette hypothèse dépend drastiquement de la gamme de stimulations réalisées. Si les stimulations utilisées et comparées évoquent des réponses sensorielles qui saturent, alors une augmentation du gain (avec augmentation du plateau) ne peut qu'améliorer la détection de ces stimuli sans modifier les capacités à les discriminer. (Figure 40).

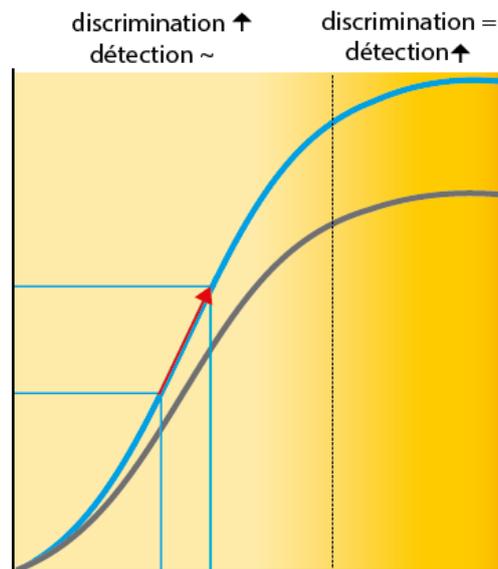


Figure 40 : Potentiels effets de la modulation des relations entrée-sortie sur les capacités à détecter ou discriminer des stimuli.

Modulation multiplicative du gain (en bleu) associée à une augmentation de la réponse maximale (R_{max}) par rapport à une condition contrôle (en noir). Pour deux stimuli proches dont les réponses évoquées se situent dans la partie linéaire de la courbe, la modulation multiplicative entraîne un différentiel de fréquence de décharge plus élevé qu'en condition contrôle (flèche rouge). Ceci peut en théorie permettre de mieux discriminer des stimuli proches. En revanche si les stimuli évoquent des réponses sensorielles qui saturent, alors le différentiel de fréquence de décharge est le même dans les deux conditions et seule la détectabilité des stimuli est améliorée (augmentation de R_{max}).

Pour s'affranchir des problèmes liés au choix du stimulus, il est préférable d'utiliser des stimulations sensorielles plus éthologiques. Par exemple, il est possible d'apprendre aux rongeurs à réaliser des tâches de discrimination de textures et d'enregistrer simultanément l'activité des neurones du cortex somesthésique (Von Heimendahl et al., 2007). Afin d'évaluer le rôle potentiel des neurones des couches 2/3 sur les capacités des rongeurs à discriminer ces textures, l'activité de ces neurones sera supprimée (ou activée) spécifiquement par photo-stimulation. De la même manière, il est possible de manipuler ces neurones pendant une tâche au cours de laquelle les rongeurs doivent détecter la présence ou l'absence d'un

objet (Guo et al., 2013; Ollerenshaw et al., 2014).

4. Potentielle diversité de connectivité de la voie canonique L2/3 vers L5

Nos résultats *in vitro* indiquent que l'activité des neurones des couches 2/3 augmente l'excitabilité des neurones de la couche 5. Toutefois, il est envisageable que les propriétés d'intégration sensorielle des neurones des couches profondes soient associées à des règles de connectivité spécifiques avec les neurones des couches superficielles. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des enregistrements extracellulaires unitaires *in vivo* des neurones des couches profondes du cortex somesthésique primaire (S1) à l'aide de tétrodes, dans différentes conditions expérimentales : lors de la photo-stimulation des neurones excitateurs des couches 2/3 (ChR2+, créneaux de 5 ms à 30 Hz pendant 1 s), ou bien lorsque la vibrisse principale (PW) des neurones enregistrés était stimulée à 30 Hz (1 s).

La photo-activation des neurones des couches 2/3 exprimant la ChR2 évoquait des réponses supraliminaires dans certains neurones des couches profondes. Ces neurones étaient caractérisés par des réponses sensorielles de faibles amplitudes (**Figure 41A en bleu**). À l'inverse, les neurones fortement activés par la stimulation de la vibrisse principale ne répondent pas de manière supraliminaire aux photo-stimulations (**Figure 41A en vert**).

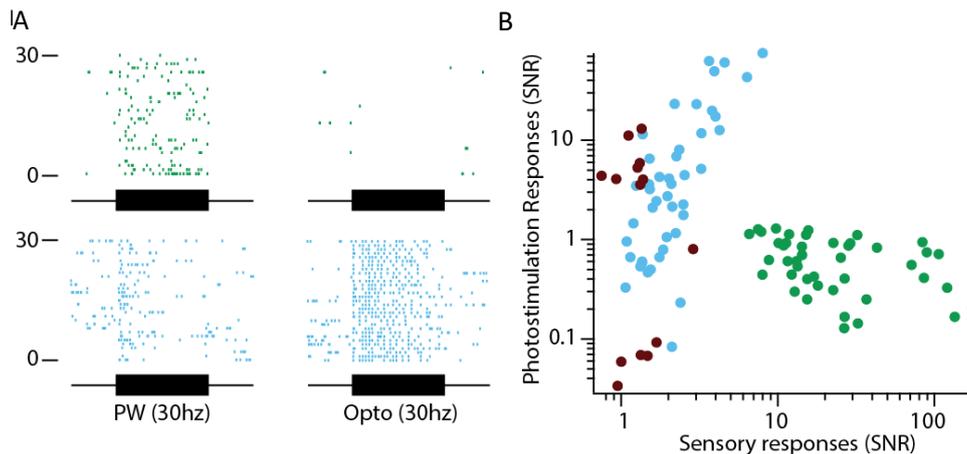


Figure 41 : Comparaison des activités des neurones des couches profondes en réponses aux stimulations sensorielles et à la photo-activation des couches 2/3 à 30 Hz.

A) Représentation en raster (chaque ligne est un essai de stimulation, chaque point est un PA) des activités de deux unités en réponses à des stimulations de la vibrisse principale à 30 Hz (PW) ou aux photo-stimulations des couches 2/3 à 30 Hz (Opto). En vert, une unité activée de manière soutenue lors des stimulations sensorielles et qui ne répond pas à la photo-stimulation ; En bleu, une unité activée de manière transitoire par la stimulation sensorielle et qui répond fortement à la photo-stimulation.

B) Représentation graphique des rapports signaux-sur-bruit (SNR) en réponse aux photo-stimulations exprimés en fonction des réponses sensorielles de tous les neurones enregistrés dans les couches profondes (n = 107). Les neurones en bleu (n = 47) et en vert (n = 43) correspondent aux populations de neurones décrites en B), les neurones rouges foncés sont des unités qui répondent fortement à la photo-stimulation et ne répondent quasiment pas à la stimulation sensorielle (n = 17, non figurés).

Comment expliquer cette différence de connectivité fonctionnelle ? Une première hypothèse serait de considérer des poids synaptiques (connexions L2/3-L5) différents en fonction des deux « types » de neurones enregistrés dans la couche 5. Ces poids synaptiques seraient plus faibles pour les neurones qui ne sont pas activés par la photo-stimulation, si bien que l'activation d'une sous-partie des neurones excitateurs des couches 2/3 n'est pas suffisante pour faire décharger ces neurones. Il est possible que l'activation d'un plus grand nombre d'afférences convergente puisse évoquer des réponses supraliminaire dans ces neurones des couches profondes.

Une autre hypothèse repose sur des différences potentielles dans les propriétés intrinsèques des neurones de la couche 5. Nous pourrions également envisager que les neurones activés par la photo-stimulation des couches 2/3 sont spontanément plus dépolarisés que les neurones non activés, donc plus proches du seuil de genèse du potentiel d'action augmentant ainsi la probabilité de décharge du neurone en réponse à la photo-stimulation. Des différences de résistances membranaires peuvent également influencer sur la manière dont le neurone intègre les potentiels post-synaptiques excitateurs en provenance des couches 2/3 : plus la résistance est grande, plus ample sera le potentiel post-synaptique évoqué.

Dans la couche 5, il a clairement été établi que les afférences thalamo-corticales venant du VPM projettent dans la couche 5B, alors que les neurones de la couche 5A reçoivent principalement des connexions en provenance du POm (Bureau et al., 2006; Petreanu et al., 2009; Constantinople and Bruno, 2013). Les différences de réponses sensorielles peuvent potentiellement correspondre à différentes dispositions laminaires (neurones à réponses fortes dans la couche 5B, à réponses faibles dans la couche 5A). Il n'est pas à exclure que les différences dans l'amplitude des réponses sensorielles soient corrélées à la localisation tangentielle des neurones. Par exemple, les neurones qui répondent faiblement à la stimulation sensorielle pourraient être préférentiellement retrouvés dans les régions septales tandis que les neurones répondant plus fortement aux stimulations sensorielles seraient situés dans une colonne relative à un barrel.

Ainsi, on peut supposer que les neurones des couches 2/3 auraient un impact différent selon le type de neurones pyramidaux de la couche 5 : la majorité des neurones pyramidaux de la couche 5B sont de morphologie « thick-tufted » et dans de plus faibles proportions de type « slender-tufted », alors que les neurones de la couche 5A sont exclusivement « slender-tufted » (Oberlaender et al., 2012). J'ai évalué différents attributs des réponses sensorielles des neurones des couches profondes : l'amplitude des réponses, les latences ou encore la précision temporelle (**Figure 42**).

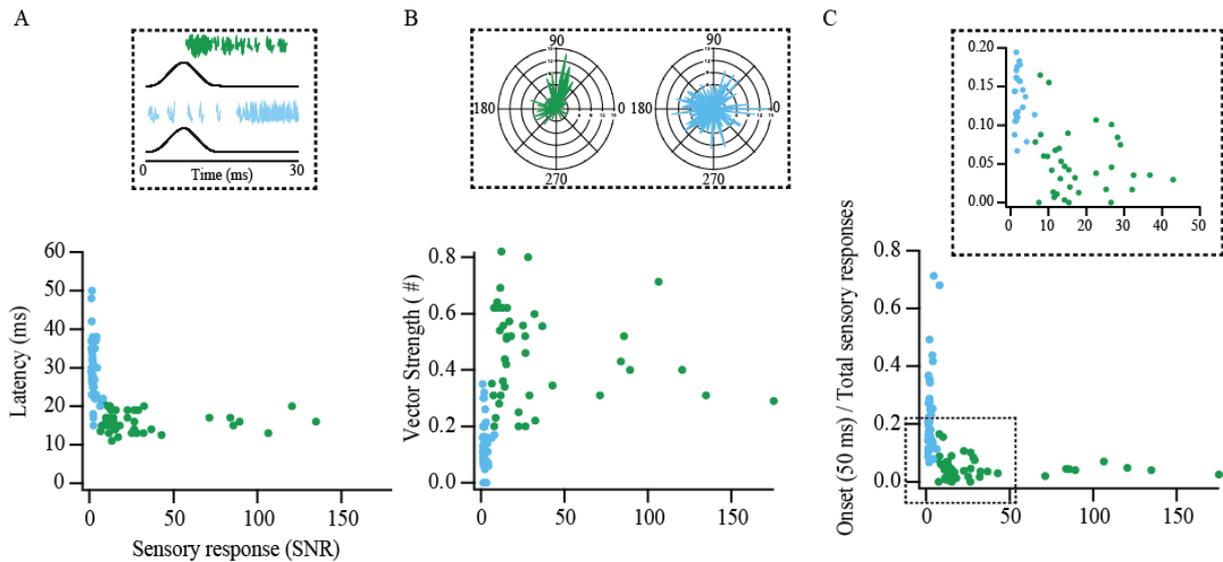


Figure 42 : Caractéristiques des réponses sensorielles en fonction des rapports signaux-sur-bruits

A) Comparaison des latences des réponses sensorielles de tous les neurones infragranulaires enregistrés, définies par l'intervalle de temps séparant le début du premier cycle de stimulation et les premiers PAs évoqués par la stimulation. Le code couleur (vert, bleu) utilisé est le même que dans la figure 3. Ainsi les neurones verts ne répondent pas de manière supraliminaire à la photo-stimulation. En haut, l'encadré en pointillés comporte deux exemples d'unités (superposition de plusieurs essais de stimulation alignés sur le premier cycle) avec des latences courtes (en vert) ou longues (en bleu).

B) Idem quand A) pour la précision temporelle, représentée par le *vector strength*. En haut, représentations polaires des relations de phases entre les réponses sensorielles et la phase des cycles de stimulations de deux unités. L'unité en vert présente des réponses en phase aux alentours de 90° ; l'unité en bleu ne présente pas de préférence de phase.

C) Comme en A) et B) pour le rapport d'amplitude des réponses prises à l'onset de la stimulation (entre 0 et 50 ms) et la réponse totale. L'encadré en haut est un agrandissement de la représentation graphique.

Il apparaît que ces caractéristiques peuvent correspondre à ce qui a été décrit auparavant à partir d'enregistrements juxta-cellulaires des deux types morphologiques des neurones de la couche 5 pendant des stimulations transitoires de la vibrisse principale (de Kock et al., 2007). Les neurones qui ne présentent pas de réponses supraliminaires à la photo-stimulation des neurones des couches 2/3 et qui répondent par de fortes fréquences de décharge, avec des latences courtes et de manière soutenue à la vibrisse principale rappellent les neurones de type *thick-tufted*. A l'inverse les neurones *slender-tufted* semblent répondre plus faiblement et avec des latences plus longues, correspondant ainsi aux neurones enregistrés dans les couches profondes qui sont activés de manière supraliminaire par la photo-excitation des couches 2/3 (**Figure 43**).

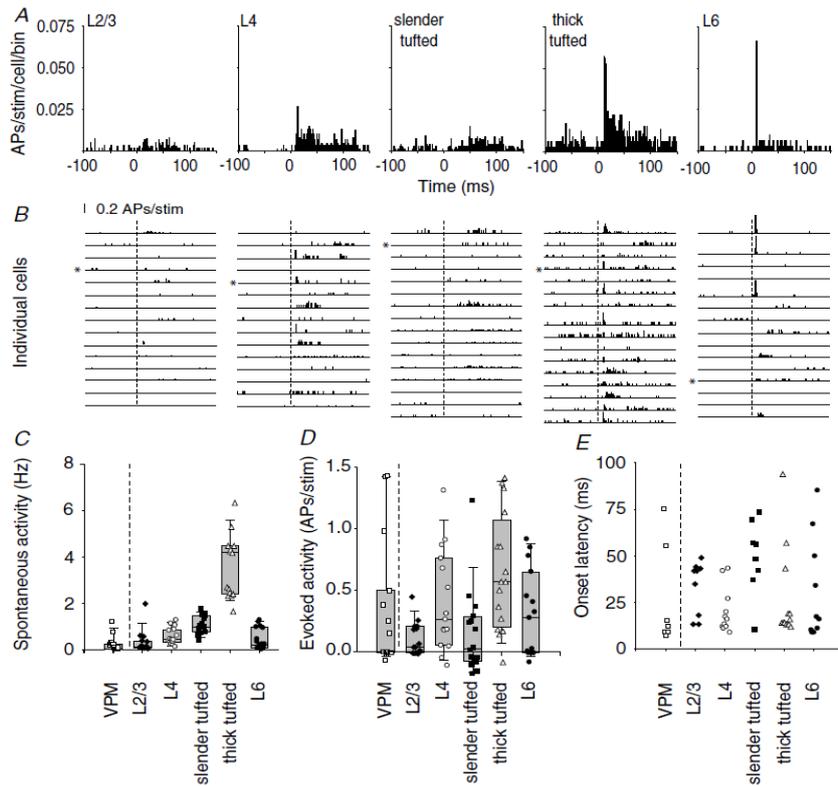


Figure 43 : Réponses sensorielles supraliminaire à la déflexion de la vibrisse principale de neurones des différentes couches corticales. Adapté de [de Kock et al., 2007].

A) PSTHs moyens de différentes populations de neurones en réponse à la déflexion de la vibrisse principale : $n = 15$ pour les couches 2/3, 4 et 5 ; $n = 16$ pour les *slender-tufted* et *thick-tufted* de la couche 5A/5B.

B) PSTHs individuels de chaque neurone enregistré dans les couches en A).

C) Quantifications des activités spontanées des différents types de neurones en fonction de leur localisation laminaire.

D) Analyse de l'amplitude des réponses entre 0-100 ms après la stimulation de chacun de ces neurones après soustraction de l'activité spontanée, les symboles représentent les neurones individuels. Les *thick-tufted* répondent en moyenne plus fortement que les *slender-tufted*.

E) Quantifications des latences des réponses sensorielles des neurones des différentes couches. Les *thick-tufted* ont globalement des latences proches des neurones enregistrés dans la couche 4 (<20 ms) tandis que les *slender-tufted* ont des latences plus longues (>30 ms).

L'amplitude des potentiels post-synaptiques évoqués dans les neurones de la couche 5 par la photo-stimulation, la caractérisation de leurs propriétés intrinsèques et la disposition laminaire de leur corps cellulaire peuvent être abordées par des enregistrements intracellulaires *in vivo*. Couplés à des injections intracellulaires d'un marqueur cellulaire (la biocytine par exemple), il sera possible de corréliser les règles de connectivités interlaminaires (L2/3-L5, activation/suppression) aux propriétés intrinsèques, synaptiques et aux réponses sensorielles (amplitudes, latences) puis de procéder à des reconstructions anatomiques des neurones enregistrés (marqués à la biocytine) pour déterminer leur organisation laminaire.

Il serait également intéressant de voir s'il existe une corrélation entre la connectivité translaminaire (L2/3-L5) et les cibles corticales ou sous-corticales des neurones des couches infragranulaires.

Il est possible d'aborder cette problématique en injectant un marqueur rétrograde (*retrobeads*) dans une zone de projection potentielle des neurones des couches profondes, d'enregistrer ces neurones de manière juxtacellulaire pour caractériser leur profil de réponses sensorielles et de connectivité translaminaire (photo-stimulation des couches 2/3) et d'injecter de la biocytine pour marquer leur corps cellulaire. La présence d'un co-marquage biocytine/retrobeads, indiquerait alors que le neurone enregistré projette vers la structure cible choisie.

5. Rôle associatif des neurones pyramidaux des couches 2/3

Au cours de la locomotion, il a été montré que le gain des neurones excitateurs des couches 2/3 était augmenté en réponse à des stimuli visuels de différentes orientations, sans modification de la sélectivité (Polack et al., 2013). Les neurones des couches 2/3 sont dépolarisés de manière tonique pendant la course, et les fluctuations du potentiel de membrane sont réduites. Cette condition comportementale est également associée à une augmentation d'activité des neurones du *Locus Coeruleus*, principale source de neuromodulation noradrénergique du cortex (Foote et al., 1980), qui serait impliquée en partie dans la dépolarisation tonique des neurones des couches 2/3.

Ainsi, les neurones des couches 2/3 peuvent être spécifiquement modulés par des états d'activités internes associés à différents contextes physiologiques. Ces modulations peuvent drastiquement impacter leurs activités spontanées, leurs propriétés intrinsèques (état de polarisation membranaire, fluctuations du potentiel de repos) ainsi que la manière dont ces neurones intègrent les informations sensorielles. Nos résultats suggèrent qu'il est possible d'observer une suppression des réponses sensorielles dans les couches profondes en photo-supprimant les couches 2/3 chez l'animal vigile, et donc potentiellement une modulation du gain des réponses sensorielles en fonction de l'activité des neurones des couches 2/3.

En plus de dépendre des états d'activités internes, les neurones des couches 2/3 d'une colonne corticale reçoivent des projections horizontales en provenance des colonnes adjacente, et intègrent également des informations sensori-motrices en provenance d'autres

aires corticales, comme le cortex moteur (M1), le cortex somesthésique secondaire (S2) ou encore le cortex somesthésique primaire controlatéral (S1-controlatéral). En agissant sur les processus d'intégration sensorielle de la couche de sortie du cortex (L5) comme le suggèrent mes résultats, il est possible que le rôle des neurones des couches 2/3 soit d'associer diverses informations sensorielles et motrices à certains états d'activités internes (neuromodulation, comportement) pour permettre la réponse comportementale la plus adaptée en modulant l'activité de la principale couche de sortie du cortex.

5.1. *Les couches 2/3 sont la cible de connectivités cortico-corticales horizontales de courtes et de longues distances*

Comme évoqué en introduction, la taille des champs récepteurs des neurones corticaux s'étend sur plusieurs vibrisses voisines. La dynamique des réponses sensorielles est telle que la stimulation d'une vibrisse entraîne l'activation des neurones appartenant aux colonnes corticales adjacentes à la principale (Ferezou et al., 2006; Roy et al., 2011). Les mécanismes sous-jacents à la propagation horizontale au sein du cortex des informations sensorielles (ou de certaines activités spontanées rythmiques), autrement appelées *traveling waves* font l'objet de nombreuses études (pour revue (Muller and Destexhe, 2012; Sato et al., 2012)). Plusieurs hypothèses issues de différents modèles (cortex visuel entre autres) tentent d'expliquer ce phénomène de propagation observé. Certaines suggèrent que les *traveling waves* ne reposent pas sur la connectivité intracorticale mais peuvent être expliquées par les projections thalamo-corticales. D'autres en revanche proposent dans le système visuel du chat un mécanisme purement cortico-cortical, notamment grâce aux projections horizontales (Bringuier et al., 1999). Ces connexions corticales horizontales sont primordiales et peuvent avoir un impact considérable sur la manière dont les signaux sensoriels sont perçus. Par exemple, il a été suggéré dans le cortex visuel primaire du chat que la perception de mouvements illusoires était sous-tendue par la propagation horizontale de l'activité corticale sous-liminaire (Jancke et al., 2004).

Egalement, lorsque la stimulation transitoire d'une vibrisse adjacente précède celle de la vibrisse principale, il est possible d'observer une réduction des réponses sensorielles des neurones de la colonne corticale correspondante (Simons and Carvell, 1989; Higley and Contreras, 2003). Cette suppression d'activité est maximale lorsque la vibrisse adjacente est stimulée quelques millisecondes (20 ms) avant la vibrisse principale, si bien qu'une stimulation quasi simultanée (décalage inférieur à 3 ms) ou avec un délai plus long (supérieur à 100 ms) n'entraîne pas ou très peu de suppression.

Il est possible que la connectivité cortico-corticale horizontale au niveau de couches 2/3 joue un rôle dans ce phénomène (appelé *cross-whisker suppression*), en mettant en jeu des mécanismes d'inhibition latérale

Par ailleurs, il a été montré que les neurones corticaux des couches profondes peuvent être sélectifs à des stimuli tactiles plus globaux, reposant sur des activations séquentielles de plusieurs vibrisses. En utilisant une matrice qui permet de stimuler de manière indépendante plusieurs vibrisses dans différentes directions (Jacob et al., 2010), il a été montré que certains neurones corticaux sont sélectifs à la direction du mouvement global de toutes les vibrisses (Jacob et al., 2008). La réponse d'un neurone pourra être maximale si les vibrisses sont stimulées les unes après les autres selon l'axe rostro-caudal par exemple. De part les importantes projections horizontales des neurones pyramidaux des couches 2/3, il est possible que l'intégration sensorielle de stimuli plus globaux repose sur cette connectivité latérale et que la modulation spécifique de ces neurones puisse altérer la manière dont les neurones des couches profondes répondent aux stimulations séquentielles des vibrisses.

Enfin, les couches 2/3 et 5 reçoivent d'importantes informations sensorielles en provenance du cortex somesthésique primaire controlatéral via les projections inter-hémisphériques qui transitent par le corps calleux dont la majeure partie est constituée d'axones des neurones pyramidaux des couches 2/3. Ainsi, dans le cortex somesthésique recevant des informations tactiles en provenance des coussinets des pattes arrières du rongeur, il a été montré que des stimulations sensorielles ipsi-latérales aux neurones corticaux enregistrés entraînaient une inhibition des réponses sensorielles des neurones de la couche 5 aux stimulations de la patte controlatérale (Palmer et al., 2012). Les auteurs suggèrent que ces projections callosales recrutent des interneurons inhibiteurs de la couche L1 du cortex controlatéral, entraînant une inhibition dendritique des neurones excitateurs de la couche 5.

Pour étudier les effets potentiels des projections callosales sur les propriétés intégratives de l'aire corticale opposée, il serait intéressant de réaliser une électroporation *in utero* de l'hémisphère ipsi-latéral aux vibrisses stimulées afin que les neurones callosaux expriment la ChR2. Il est envisageable que les effets décrits précédemment puissent être retrouvés au sein du barrel cortex. Si tel est le cas, associer ces modulations optogénétiques à des stimulations sensorielles bilatérales pourrait révéler la nature des informations sensorielles transmises par les projections cortico-corticales longues distances.

5.2. *Les réseaux corticaux sont plastiques : altérations de la connectivité des couches 2/3*

Les synapses intracorticales (canoniques ou non, intra- ou interlaminaires) des couches 2/3 et 5 sont sujettes à différentes formes de plasticité tout au long de la vie de l'animal (les plasticités affectant la couche 4 ne seront pas discutées, mais semblent concerner principalement les premiers jours du développement postnatal (Diamond et al., 1994)). Ces plasticités peuvent être induites entre autres par l'expérience sensorielle du rongeur ou encore par l'apprentissage associatif d'une information sensorielle à un événement externe. Par exemple, les expériences de privations sensorielles (« ablation » d'une ou plusieurs vibrisses) ont montré que la stimulation de la vibrisse épargnée évoque une activité dans les couches 2/3 qui se propage à partir de la colonne principale aux autres colonnes de manière plus étendue qu'avant la privation sensorielle. À l'inverse, les vibrisses coupées évoquent des réponses sensorielles dont la propagation au sein des couches 2/3 est largement réduite (pour revue : (Feldman and Brecht, 2005)). Ainsi, l'activité dépendante de l'expérience peut modifier certaines composantes caractérisant les circuits neuronaux récurrents : la force des synapses, la formation de nouvelles connexions synaptiques ou au contraire l'élimination de certaines synapses. Ces altérations de la connectivité corticale peuvent avoir des effets extrêmement importants sur la manière dont les neurones intègrent les informations sensorielles. Par exemple, il a été montré que la privation sensorielle entraîne, dans les colonnes correspondant aux vibrisses coupées, une réduction drastique de l'inhibition récurrente dans les couches 2/3 (Shao et al., 2013). Cet effet s'accompagne d'une réduction de la représentation fréquentielle du rythme gamma (30-90 Hz) dans les oscillations spontanées et évoquées des potentiels de champs locaux. Le rythme gamma est suspecté de jouer un rôle primordial dans l'intégration des informations sensorielles (Womelsdorf et al., 2006; Jutras et al., 2009; Ni et al., 2016). Nous avons observé *in vivo* que des stimulations à 30 Hz d'une partie des neurones excitateurs des couches 2/3 exprimant la ChR2 induisaient une inhibition latérale (données non figurées), comme cela a été décrit auparavant dans le cadre de stimulations entraînant une rythmicité auto-entretenu dans la gamme de fréquence gamma (Adesnik and Scanziani, 2010). L'expérience sensorielle de l'animal, en modifiant la connectivité fonctionnelle du réseau récurrent des couches 2/3, pourrait transformer la manière dont les couches 2/3 modulent les réponses sensorielles dans la couche de sortie du cortex. Un autre exemple de modification de la connectivité corticale induite par apprentissage associatif a été mis en exergue par Rosselet et collaborateurs. Ces auteurs ont appris à des souris à associer la stimulation d'une vibrisse à un stimulus aversif (choc électrique), puis ont évalué différents

paramètres de la connectivité corticale de la colonne correspondante et de deux colonnes adjacentes *in vitro*. Après apprentissage, ces auteurs révèlent que certaines connexions synaptiques étaient renforcées : au sein des colonnes adjacentes les connexions excitatrices dans la couche 3 en provenance de la couche 5A ($L5A_{\text{adjacente}} \rightarrow L3_{\text{adjacente}}$) et celles en provenance des couches 2/3 et 4 de la colonne principale (associée au stimulus aversif, $L2/3_{\text{principale}} \rightarrow L2/3_{\text{adjacente}}$; $L4_{\text{principale}} \rightarrow L2/3_{\text{adjacente}}$) sont renforcées (Rosset et al., 2011). Ces résultats suggèrent dans un tout autre contexte (apprentissage associatif) que la connectivité corticale est extrêmement plastique et que cette plasticité peut permettre le renforcement des forces synaptiques de certains circuits corticaux.

En conclusion, la couche 5 du cortex classiquement définie comme la couche de sortie peut être modulée par l'activité des neurones des couches 2/3 au cours de l'intégration sensorielle. Cette modulation par les couches 2/3 pourrait être contextuelle, puisque l'activité de ces neurones dépend de l'influence des activités générées par différents états internes (neuromodulation, attention, locomotion, whisking ...), par ses relations avec les réseaux neuronaux des autres aires corticales (cortex moteur, somesthésique secondaire, primaire controlatéral) et peut être affectée par différentes formes de plasticités synaptiques (induites par l'expérience sensorielle, l'apprentissage, etc.). Les neurones des couches 2/3 semblent être au cœur d'un centre opérateur associatif qui permettrait de régler finement les réponses sensorielles de sous-réseaux neuronaux des couches profondes de sortie du cortex, dans le but ultime de générer la réponse comportementale la plus appropriée au contexte extérieur dans lequel l'animal est inscrit.

6. Perspectives générales

L'expression spécifique des opsines photo-activables (ChR2, Arch) au niveau d'une population de neurones corticaux grâce à la technique d'électroporation *in utero* offre la possibilité de coupler des manipulations réversibles et temporellement précises de l'activité de ces neurones à des enregistrements électrophysiologiques chez la souris anesthésiée ou éveillée. Cette approche m'a permis d'étudier le rôle de la connectivité corticale dans le déterminisme des réponses sensorielles de neurones individuels. Toutefois mes conditions d'enregistrements électrophysiologiques ne m'ont pas permis pas d'évaluer le rôle de la connectivité corticale dans les processus de codage populationnel. En effet, à l'aide d'une seule tétrode pour enregistrer l'activité d'une colonne corticale, je n'ai enregistré au maximum que 3 neurones à la fois. Le récent développement des techniques d'imageries bi-photoniques permet maintenant d'enregistrer simultanément de bien plus larges populations

de neurones (plus d'une centaine à la fois) avec une résolution spatiale à l'échelle du neurone. Ces techniques reposent sur l'enregistrement optique des transitoires calciques, reflets de l'émission de potentiels d'action, grâce à un indicateur calcique : les GCaMP, protéines de fusion entre un senseur calcique (la calmoduline) et une protéine fluorescente (Packer et al., 2015). Généralement utilisée pour étudier les couches les plus superficielles du cortex, de récents travaux suggèrent qu'il est possible d'utiliser cette technique d'imagerie optique pour étudier les couches profondes, et plus particulièrement la couche 5 (Lur et al., 2016). Ces auteurs couplent cette technique à des marquages rétrogrades des neurones de la couche 5, ce qui leur permet d'étudier spécifiquement les réponses sensorielles des neurones pyramidaux de la couche 5 en fonction de leurs zones de projections. Ainsi cette technique peut permettre d'aborder des questions plus complexes sur la dynamique spatio-temporelle d'une large population de neurones spécifiques enregistrés en même temps. Par exemple, déterminer l'impact de la photo-suppression des couches 2/3 sur la corrélation temporelle et la synchronie de l'activité des neurones de la couche 5 serait l'une des premières questions que j'aborderais à l'aide de cette technique. La microscopie bi-photonique permet également de réaliser des stimulations holographiques, dont la résolution spatiale est d'une précision telle qu'il devient possible de photo-activer une seule colonne corticale contrairement à la fibre optique LED qui illumine une vaste zone du cortex. Ces stimulations spatialement plus précises permettent d'adresser des questions fondamentales sur les interactions horizontales entre des colonnes corticales au cours de l'intégration sensorielle.

Enfin, les manipulations optogénétiques sont extrêmement utiles pour étudier la relation entre des connexions neuronales et leur rôle fonctionnel. Pouvoir agir au cours d'une tâche comportementale directement sur l'activité des neurones et ce de manière réversible, permet éventuellement d'établir les liens qui unissent une structure et sa fonction. Bien que réalisables chez la souris, il est primordial de pouvoir étudier le comportement d'organismes modèles plus proches de l'Homme. Grâce au développement des technologies virales (AAV, lentivirus) il est possible d'exprimer la ChR2 dans les neurones corticaux du primate. Ce modèle permet d'utiliser des protocoles comportementaux et des stimulations sensorielles beaucoup plus complexes et variés que ne le permet le modèle du rongeur.

Bibliographie

- Adesnik H, Scanziani M (2010) Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464:1155–1160 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414303>.
- Agmon A, Connors BW (1989) Repetitive burst-firing neurons in the deep layers of mouse somatosensory cortex. *Neurosci Lett* 99:137–141.
- Ahissar E, Sosnik R, Haidarliu S (2000) Transformation from temporal to rate coding in a somatosensory thalamocortical pathway. *Nature* 406:302–306 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10917531>.
- Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S, Charpier S (2014) Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J Physiol* 592:3577–3595 Available at: </pmc/articles/PMC4229349/?report=abstract> [Accessed December 15, 2015].
- Andersen RA, Mountcastle VB (1983) The influence of the angle of gaze upon the excitability of the light-sensitive neurons of the posterior parietal cortex. *J Neurosci* 3:532–548 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/3/3/532.full.pdf> [Accessed March 14, 2017].
- Anderson CT, Sheets PL, Kiritani T, Shepherd GM (2010) Sublayer-specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. *Nat Neurosci* 13:739–744 Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.2538> [Accessed February 13, 2017].
- Arabzadeh E, Petersen RS, Diamond ME (2003) Encoding of whisker vibration by rat barrel cortex neurons: implications for texture discrimination. *J Neurosci* 23:9146–9154 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534248>.
- Arabzadeh E, Zorzin E, Diamond ME (2005) Neuronal encoding of texture in the whisker sensory pathway. *PLoS Biol* 3.
- Ascoli GA et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557–568 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568015>.
- Atallah B V, Bruns W, Carandini M, Scanziani M (2012) Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73:159–170 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3743079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2014].
- Bannister AP, Thomson AM (2007) Dynamic Properties of Excitatory Synaptic Connections Involving Layer 4 Pyramidal Cells in Adult Rat and Cat Neocortex. *Cereb Cortex* 17:2190–2203.
- Bellavance M-A, Demers M, Deschênes M (2010) Feedforward inhibition determines the angular tuning of vibrissal responses in the principal trigeminal nucleus. *J Neurosci* 30:1057–1063.
- Bialek W, Rieke F (1992) Reliability and information transmission in spiking neurons. *Trends*

Bibliographie

- Neurosci 15:428–434.
- Bialek W, Rieke F, de Ruyter van Steveninck RR, Warland D (1991) Reading a neural code. *Science* (80-) 252:1854–1857 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2063199>.
- Bolouri AR, Jenks RA, Desbordes G, Stanley GB (2010) Encoding and decoding cortical representations of tactile features in the vibrissa system. *J Neurosci* 30:9990–10005 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668184>.
- Bortone DS, Olsen SR, Scanziani M (2014) Translaminar inhibitory cells recruited by layer 6 corticothalamic neurons suppress visual cortex. *Neuron* 82:474–485 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656931> [Accessed September 1, 2014].
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116447>.
- Brecht M, Roth A, Sakmann B (2003) Dynamic Receptive Fields of Reconstructed Pyramidal Cells in Layers 3 and 2 of Rat Somatosensory Barrel Cortex. *J Physiol* 553:243–265 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2003.044222> [Accessed February 28, 2017].
- Brecht M, Sakmann B (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* 543:49–70 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181281>.
- Bringuier V, Chavane F, Glaeser L, Fregnac Y (1999) Horizontal propagation of visual activity in the synaptic integration field of area 17 neurons. *Science* (80-) 283:695–699 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924031>.
- Brown SP, Hestrin S (2009) Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 457:1133–1136 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07658> [Accessed January 29, 2015].
- Bruno RM, Sakmann B (2006) Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* (80-) 312:1622–1627 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778049>.
- Bureau I, Shepherd GM, Svoboda K (2004) Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron* 42:789–801.
- Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K (2006) Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* 4:e382 Available at: <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0040382> [Accessed May 19, 2015].
- Cardin J a, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai L-H, Moore CI (2010) Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nat Protoc* 5:247–254 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].

Bibliographie

- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai L-H, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663–667 Available at: <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v459/n7247/full/nature08002.html> [Accessed February 18, 2016].
- Cardin JA, Palmer LA, Contreras D (2008) Cellular mechanisms underlying stimulus-dependent gain modulation in primary visual cortex neurons in vivo. *Neuron* 59:150–160 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089662730800411X> [Accessed December 15, 2015].
- Carvell G, Simons D (1996) Abnormal tactile experience early in life disrupts active touch. *J Neurosci* 16.
- Carvell GE, Simons D (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638–2648 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2388081>.
- Chance FS, Abbott L., Reyes AD (2002) Gain Modulation from Background Synaptic Input. *Neuron* 35:773–782 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627302008206> [Accessed November 9, 2015].
- Chen JL, Carta S, Soldado-Magraner J, Schneider BL, Helmchen F (2013) Behaviour-dependent recruitment of long-range projection neurons in somatosensory cortex. *Nature* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792559>.
- Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE, Boyden ES (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463:98–102 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08652>.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99–104.
- Connors BW, Gutnick MJ, Prince DA (1982) Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 48:1302–1320 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6296328>.
- Constantinople CM, Bruno RM (2013) Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science* 340:1591–1594 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4203320&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].
- Crochet S, Petersen CC (2006) Correlating whisker behavior with membrane potential in barrel cortex of awake mice. *Nat Neurosci* 9:608–610 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1690> [Accessed March 29, 2017].
- de Kock CPJ, Bruno RM, Spors H, Sakmann B (2007) Layer- and cell-type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. *J Physiol* 581:139–154 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2075227&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed September 8, 2014].

Bibliographie

- Destexhe A, Rudolph M, Pare D (2003) The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat Rev Neurosci* 4:739–751 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951566>.
- Diamond M, Huang W, Ebner F (1994) Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity. *Science* (80-) 265 Available at: <http://science.sciencemag.org/content/265/5180/1885.long> [Accessed March 31, 2017].
- Diamond ME, Armstrong-James M, Budway MJ, Ebner FF (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: Dependence on the barrel field cortex. *J Comp Neurol* 319:66–84 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.903190108> [Accessed September 19, 2016].
- Drager UC (1975) Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 160:269–290.
- Feldman DE, Brecht M (2005) Map Plasticity in Somatosensory Cortex. *Science* (80-) 310 Available at: <http://science.sciencemag.org/content/310/5749/810/tab-pdf> [Accessed March 31, 2017].
- Feldmeyer D, Egger V, Lubke J, Sakmann B (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, Lübke J, Sakmann B (2006) Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. *J Physiol* 575:583–602 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2006.105106> [Accessed February 28, 2017].
- Ferenczi E, Deisseroth K (2012) When the electricity (and the lights) go out: transient changes in excitability. *Nat Neurosci* 15:1058–1060 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837032>.
- Ferezou I, Bolea S, Petersen CC (2006) Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice. *Neuron* 50:617–629 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701211> [Accessed February 6, 2017].
- Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, Petersen CC (2007) Spatiotemporal Dynamics of Cortical Sensorimotor Integration in Behaving Mice. *Neuron* 56:907–923 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054865> [Accessed February 6, 2017].
- Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Neurobiology* 77:3033–3037 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349541/pdf/pnas00492-0688.pdf> [Accessed March 30, 2017].
- Ganmor E, Katz Y, Lampl I (2010) Intensity-dependent adaptation of cortical and thalamic neurons is controlled by brainstem circuits of the sensory pathway. *Neuron* 66:273–286 Available at: <http://ac.els-cdn.com/S0896627310002357/1-s2.0-S0896627310002357->

Bibliographie

- main.pdf?_tid=4c2e5b6a-04dc-11e7-839b-00000aab0f01&acdnat=1489073167_d7f89c466ec1a9ffd14b4af2b06a5260 [Accessed March 9, 2017].
- Georgopoulos A, Schwartz A, Kettner R (1986) Neuronal population coding of movement direction. *Science* (80-) 233:1416–1419 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3749885> [Accessed March 13, 2017].
- Georgopoulos AP, Kalaska JF, Caminiti R, Massey JT (1982) ON THE RELATIONS BETWEEN THE DIRECTION OF TWO-DIMENSIONAL ARM MOVEMENTS AND CELL DISCHARGE IN PRIMATE MOTOR CORTEX. *J Neurosci* 2:1527–1537 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/2/11/1527.full.pdf> [Accessed March 13, 2017].
- Georgopoulos AP, Lurito JT, Petrides M, Schwartz AB, Massey JT (1989) Mental Rotation of Three-Dimensional Objects. *Science* (80-) 171:701–703 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5540314> [Accessed March 13, 2017].
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120–125 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/552600> [Accessed December 10, 2015].
- Goard M, Dan Y (2009) Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nat Neurosci* 12:1444–1449 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2402> <http://www.nature.com/neuro/journal/v12/n11/full/nn.2402.html>.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917–925 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14586460> <http://www.nature.com/nature/journal/v425/n6961/pdf/nature02033.pdf>.
- Gray CM, McCormick DA (1996) Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science* (80-) 274:109–113 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810245>.
- Guo Z V, Li N, Huber D, Ophir E, Gutnisky D, Ting JT, Feng G, Svoboda K (2013) Flow of Cortical Activity Underlying a Tactile Decision in Mice. *Neuron* Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313009240> [Accessed February 13, 2017].
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, Yu Y, McCormick DA (2007) Enhancement of Visual Responsiveness by Spontaneous Local Network Activity In Vivo. *J Neurophysiol* 97 Available at: <http://jn.physiology.org/content/97/6/4186.long> [Accessed April 19, 2017].
- Haider B, McCormick DA (2009) Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron* 62:171–189 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089662730900289X> [Accessed September 22, 2015].
- Han X, Boyden ES (2007) Multilpe-color optical activation, silencing, and desynchronization

Bibliographie

- of neural activity, with single-spike temporal resolution. PLoS One 2 Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0000299&type=printable> [Accessed March 6, 2017].
- Harris KD, Mrsic-Flogel TD (2013) Cortical connectivity and sensory coding. *Nature* 503:51–58 Available at: <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nature/journal/v503/n7474/full/nature12654.html> [Accessed February 11, 2015].
- Harris RM, Woolsey TA (1979) Morphology of Golgi-impregnated neurons in mouse cortical barrels following vibrissae damage at different post-natal ages.
- Higley MJ, Contreras D (2003) Nonlinear integration of sensory responses in the rat barrel cortex: an intracellular study in vivo. *J Neurosci* 23:10190–10200 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614077>.
- Higley MJ, Contreras D (2005) Integration of synaptic responses to neighboring whiskers in rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* 93:1920–1934 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548623>.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* 26:448–457 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407542>.
- Hô N, Destexhe A (2000) Synaptic background activity enhances the responsiveness of neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 84:1488–1496 Available at: <http://jn.physiology.org/content/jn/84/3/1488.full.pdf> [Accessed March 13, 2017].
- Hooks BM, Hires SA, Zhang Y-X, Huber D, Petreanu L, Svoboda K, Shepherd GM (2011) Laminar analysis of excitatory local circuits in vibrissal motor and sensory cortical areas. *PLoS Biol* 9:e1000572 Available at: [/pmc/articles/PMC3014926/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3014926/?report=abstract) [Accessed November 3, 2015].
- Huang W, Armstrong-James M, Rema V, Diamond ME, Ebner FF (1998) Contribution of supragranular layers to sensory processing and plasticity in adult rat barrel cortex. *J Neurophysiol* 80:3261–3271 Available at: [file://t/1998/Huang_Ebner_JNP_1998.pdf](http://t/1998/Huang_Ebner_JNP_1998.pdf).
- Hubel DH, Wiesel TN (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* 148:574–591 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1959.sp006308> [Accessed September 6, 2016].
- Hubel DH, Wiesel TN (1961) Integrative action in the cat's lateral geniculate body. *J Physiol* 155:385–398 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1961.sp006635> [Accessed September 6, 2016].
- Hubel DH, Wiesel TN (1963) Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J Physiol* 165:559–568 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1963.sp007079> [Accessed September 6, 2016].
- Hubel DH, Wiesel TN (1968) Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol* 195:215–243 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1968.sp008455> [Accessed September 6, 2016].
- HUBEL DH, WIESEL TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional

Bibliographie

- architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106–154 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14449617> [Accessed September 6, 2016].
- Huber D, Petreanu L, Ghitani N, Ranade S, Hromádka T, Mainen Z, Svoboda K (2008) Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451:61–64 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3425380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 14, 2014].
- Ince RA, Senatore R, Arabzadeh E, Montani F, Diamond ME, Panzeri S (2010) Information-theoretic methods for studying population codes. *Neural Netw* 23:713–727 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542408>.
- Jacob V, Estebanez L, Le Cam J, Tiercelin JY, Parra P, Paresys G, Shulz DE (2010) The Matrix: a new tool for probing the whisker-to-barrel system with natural stimuli. *J Neurosci Methods* 189:65–74 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362614>.
- Jacob V, Le Cam J, Ego-Stengel V, Shulz DE (2008) Emergent Properties of Tactile Scenes Selectively Activate Barrel Cortex Neurons. *Neuron* 60:1112–1125.
- Jacquin MF, Renehan WE, Rhoades RW, Panneton WM (1993) Morphology and topography of identified primary afferents in trigeminal subnuclei principalis and oralis. *J Neurophysiol* 70.
- Jadhav SP, Wolfe J, Feldman DE (2009) Sparse temporal coding of elementary tactile features during active whisker sensation. *Nat Neurosci* 12:792–800 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430473>.
- Jancke D, Chavane F, Naaman S, Grinvald A (2004) Imaging cortical correlates of illusion in early visual cortex. *Nature* 428 VN-:423–426 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02396>.
- Jones LM, Lee S, Trageser JC, Simons D, Keller A (2004) Precise temporal responses in whisker trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 92:665–668 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999053>.
- Jutras MJ, Fries P, Buffalo EA (2009) Gamma-Band Synchronization in the Macaque Hippocampus and Memory Formation. *J Neurosci* 29:12521–12531 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785486/pdf/nihms157775.pdf> [Accessed March 31, 2017].
- Katz LC, Dalva MB (1994) Scanning laser photostimulation: a new approach for analyzing brain circuits. *J Neurosci Methods* 54:205–218.
- Khatri V, Hartings J a, Simons D (2004) Adaptation in thalamic barreloid and cortical barrel neurons to periodic whisker deflections varying in frequency and velocity. *J Neurophysiol* 92:3244–3254 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306632> [Accessed September 9, 2014].
- Kim J, Matney CJ, Blankenship A, Hestrin S, Brown SP (2014) Layer 6 corticothalamic neurons activate a cortical output layer, layer 5a. *J Neurosci* 34:9656–9664 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031405>.

Bibliographie

- Kravitz A V., Freeze BS, Parker PRL, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Neuro Paper Prompt 2. *Nature* 466:622–626 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09159> [Accessed March 7, 2017].
- Kuffler SW (1953) Discharge Patterns and Functional Organization of Mammalian Retina. *J Neurophysiol* 16:37–68 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13035466> [Accessed September 6, 2016].
- Land PW, Simons D (1985) Cytochrome oxidase staining in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol* 238:225–235 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.902380209> [Accessed September 19, 2016].
- Lanyi JK, Oesterhelt D (1982) Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin. *J Biol Chem* 257:2674–2677.
- Lee W-CA, Bonin V, Reed M, Graham BJ, Hood G, Glattfelder K, Reid RC (2016) Anatomy and function of an excitatory network in the visual cortex. *Nature* 532:370–374 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature17192> [Accessed September 12, 2016].
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria J-C, Petersen CC (2009) The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61:301–316 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627308010921> [Accessed February 25, 2015].
- Lichtenstein SH, Carvell GE, Simons D (1990) Responses of rat trigeminal ganglion neurons to movements of vibrissae in different directions. *Somat Mot Res* 7:47–65.
- Lima SQ, Hromadka T, Znamenskiy P, Zador AM (2009) PINP: a new method of tagging neuronal populations for identification during in vivo electrophysiological recording. *PLoS One* 4:e6099 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584920>.
- London M, Roth A, Beeren L, Hausser M, Latham PE (2010) Sensitivity to perturbations in vivo implies high noise and suggests rate coding in cortex. *Nature* 466:123–127 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596024>.
- Lur G, Vinck MA, Tang L, Cardin JA, Higley MJ (2016) Projection-Specific Visual Feature Encoding by Layer 5 Cortical Subnetworks. *Cell Rep* 14:2538–2545 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805451/pdf/nihms762658.pdf> [Accessed April 21, 2017].
- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1995) Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* 268:1503–1506 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7770778> [Accessed September 9, 2016].
- Malpeli JG (1983) Activity of cells in area 17 of the cat in absence of input from layer a of lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 49:595–610 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6834088> [Accessed September 10, 2016].
- Manns ID, Sakmann B, Brecht M (2004) Sub- and suprathreshold receptive field properties of pyramidal neurones in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol* 556:601–622 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2003.053132> [Accessed February 28, 2017].

Bibliographie

- Mattis J, Tye KM, Ferenczi EA, Ramakrishnan C, O'Shea DJ, Prakash R, Gunaydin LA, Hyun M, Fenno LE, Gradinaru V, Yizhar O, Deisseroth K (2012) Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods* 9:159–172 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179551>.
- Mcadams CJ, Maunsell JHR (1999) Effects of Attention on the Reliability of Individual Neurons in Monkey Visual Cortex. *Neuron* 23:765–773 Available at: [http://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273\(01\)80034-9.pdf](http://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273(01)80034-9.pdf) [Accessed March 14, 2017].
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782–806 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999347> [Accessed September 13, 2016].
- Mcginley MJ, Vinck M, Reimer J, Batista-Brito R, Zaghera E, Cadwell CR, Tolias AS, Cardin JA, McCormick DA (2015) Perspective Waking State: Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses. *Neuron* 87:1143–1161 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.012> [Accessed March 14, 2017].
- Mignard, M ; Malpeli JG (1991) Paths of information flow through visual cortex. *Science* (80-) 251:1789–1793.
- Minnery BS, Bruno RM, Simons D (2003) Response transformation and receptive-field synthesis in the lemniscal trigeminothalamic circuit. *J Neurophysiol* 90:1556–1570 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724362>.
- Minnery BS, Simons D (2003a) Response properties of whisker-associated trigeminothalamic neurons in rat nucleus principalis. *J Neurophysiol* 89:40–56 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522158> [Accessed September 9, 2014].
- Minnery BS, Simons D (2003b) Response properties of whisker-associated trigeminothalamic neurons in rat nucleus principalis. *J Neurophysiol* 89:40–56 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522158>.
- Miyashita T, Shao YR, Chung J, Pourzia O, Feldman DE (2013) Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits* 7:8 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3560348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moore CI, Nelson SB (1998) Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 80:2882–2892 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862892>.
- Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4:701–722 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153131>.
- Mountcastle VB, Davies PW, Berman AL (1957) Response properties of neurons of cat's somatic sensory cortex to peripheral stimuli. *J Neurophysiol* 20:374–407 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13439409>.
- Muller L, Destexhe A (2012) Propagating waves in thalamus, cortex and the thalamocortical

Bibliographie

- system: Experiments and models. *J Physiol Paris* 106:222–238 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2012.06.005>.
- Murphy BK, Miller KD (2003) Multiplicative gain changes are induced by excitation or inhibition alone. *J Neurosci* 23:10040–10051 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/31/10040.full.pdf> [Accessed March 28, 2017].
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science* (80-) 296:2395–2398 Available at: <http://www.sciencemag.org/content/296/5577/2395><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089443><http://www.sciencemag.org/content/296/5577/2395.full.pdf><http://www.sciencemag.org/content/296/5577/2395.long>.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13940–13945 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=283525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 16, 2017].
- Nathanson JL, Yanagawa Y, Obata K, Callaway EM (2009) Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Neuroscience* 161:441–450 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2728494/pdf/nihms104788.pdf> [Accessed March 14, 2017].
- Ni J, Wunderle T, Lewis CM, Desimone R, Diester I, Fries P, Fries P, Agha NS, Wang J, Nurmikko AV (2016) Gamma-Rhythmic Gain Modulation. *Neuron* 92:240–251 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667008> [Accessed March 31, 2017].
- Nicolelis M, Chapin J (1994) Spatiotemporal structure of somatosensory responses of many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J Neurosci* 14.
- Niell CM, Stryker MP (2008) Highly Selective Receptive Fields in Mouse Visual Cortex. *J Neurosci* 28:7520–7536 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0623-08.2008> [Accessed September 6, 2016].
- Niell CM, Stryker MP (2010) Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron* 65:472–479 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3184003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].
- Nowak LG, Azouz R, Sanchez-Vives M V, Gray CM, McCormick D a (2003) Electrophysiological classes of cat primary visual cortical neurons in vivo as revealed by quantitative analyses. *J Neurophysiol* 89:1541–1566 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626627> [Accessed July 23, 2014].
- Nuñez A, Amzica F, Steriade M (1993) Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties and synaptic responses. *J Neurophysiol* 70:418–430 Available

Bibliographie

- at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395586> [Accessed September 13, 2016].
- O'Connor DH, Hires SA, Guo Z V, Li N, Yu J, Sun Q-Q, Huber D, Svoboda K (2013) Neural coding during active somatosensation revealed using illusory touch. *Nat Neurosci* 16:958–965 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3695000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 13, 2017].
- Oberlaender M, Boudewijns ZS, Kleele T, Mansvelder HD, Sakmann B, de Kock CP (2011) Three-dimensional axon morphologies of individual layer 5 neurons indicate cell type-specific intracortical pathways for whisker motion and touch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4188–4193 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368112>.
- Oberlaender M, De Kock CPJ, Bruno RM, Ramirez A, Meyer HS, Dercksen VJ, Helmstaedter M, Sakmann B (2012) Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex* 22:2375–2391.
- Ollerenshaw DR, Zheng HJ, Millard DC, Wang Q, Stanley GB (2014) The Adaptive Trade-Off between Detection and Discrimination in Cortical Representations and Behavior. *Neuron* 81:1152–1164 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607233>.
- Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M (2012) Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature* 483:47–52 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10835> [Accessed December 15, 2015].
- Packer AM, Peterka DS, Hirtz JJ, Prakash R, Deisseroth K, Yuste R (2012) Two-photon optogenetics of dendritic spines and neural circuits. *Nat Methods* 9:1202–1205 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2249>.
- Packer AM, Russell LE, Dalgleish HWP, Häusser M (2015) Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo. *Nat Methods* 12:140–146 Available at: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms [Accessed April 21, 2017].
- Palmer LM, Schulz JM, Murphy SC, Ledergerber D, Murayama M, Larkum ME (2012) The Cellular Basis of GABAB-Mediated Interhemispheric Inhibition. *Science* (80-) 335:989–993 Available at: <http://www.sciencemag.org/content/335/6071/989.abstract>.
- Papagiakoumou E, Anselmi F, Bègue A, de Sars V, Glückstad J, Isacoff EY, Emiliani V (2010) Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2. *Nat Methods* 7:848–854 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1505>.
- Petreaunu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K (2007) Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 10:663–668 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435752> [Accessed July 10, 2014].
- Petreaunu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K (2009) The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457:1142–1145 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2745650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 13, 2017].
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M (2013) Inhibition of inhibition in visual

Bibliographie

- cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* 16:1068–1076 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817549>.
- Pidoux M, Mahon S, Deniau J-M, Charpier S (2011) Integration and propagation of somatosensory responses in the corticostriatal pathway: an intracellular study *in vivo*. *J Physiol* 589:263–281 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2010.199646> [Accessed March 1, 2017].
- Pinto DJ, Brumberg JC, Simons D (2000) Circuit dynamics and coding strategies in rodent somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 83:1158–1166 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712446>.
- Pluta S, Naka A, Veit J, Telian G, Yao L, Hakim R, Taylor D, Adesnik H (2015) A direct translaminal inhibitory circuit tunes cortical output. *Nat Neurosci* advance on Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4123> [Accessed September 29, 2015].
- Polack PO, Friedman J, Golshani P (2013) Cellular mechanisms of brain state-dependent gain modulation in visual cortex. *Nat Neurosci* 16:1331–1339 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3786578&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Poulet JF, Petersen CC (2008) Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. *Nature* 454:881–885 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633351>.
- Prigge M, Schneider F, Tsunoda SP, Shilyansky C, Wietek J, Deisseroth K, Hegemann P (2012) Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics. *J Biol Chem* 287:31804–31812 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10870> [Accessed February 16, 2017].
- Ramirez A, Pnevmatikakis EA, Merel J, Paninski L, Miller KD, Bruno RM (2014) Spatiotemporal receptive fields of barrel cortex revealed by reverse correlation of synaptic input. *Nat Neurosci* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836076>.
- Reinagel P, Reid RC (2000) Temporal coding of visual information in the thalamus. *J Neurosci* 20:5392–5400 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884324> [Accessed September 9, 2016].
- Rieke F (1999) *Spikes: Exploring the Neural Code* Computational Neuroscience.
- Ritt JT, Andermann ML, Moore CI (2008) Embodied information processing: vibrissa mechanics and texture features shape micromotions in actively sensing rats. *Neuron* 57:599–613 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304488>.
- Rosselet C, Fieschi M, Hugues S, Bureau I (2011) Associative Learning Changes the Organization of Functional Excitatory Circuits Targeting the Supragranular Layers of Mouse Barrel Cortex. *Front Neural Circuits* 4:1–11 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3024829/pdf/fncir-04-00126.pdf> [Accessed March 31, 2017].
- Roy NC, Bessaih T, Contreras D (2011) Comprehensive mapping of whisker-evoked responses reveals broad, sharply tuned thalamocortical input to layer 4 of barrel cortex. *J*

Bibliographie

- Neurophysiol 105:2421–2437 Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3094161&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed August 14, 2014].
- Saito T (2006) In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc* 1:1552–1558 Available at:
<http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nprot/journal/v1/n3/pdf/nprot.2006.276.pdf> [Accessed March 6, 2017].
- Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64:404–418 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914188>.
- Sakata S, Harris KD (2012) Laminar-dependent effects of cortical state on auditory cortical spontaneous activity. *Front Neural Circuits* 6:109 Available at:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2012.00109/abstract> [Accessed March 27, 2017].
- Salinas E, Sejnowski T. (2001) Correlated Neuronal Activity And The Flow Of Neural Information. *Nat Rev Neurosci* 2:539–550 Available at:
[file:///C:/Users/micha/Downloads/Nature Reviews Neuroscience Volume 2 issue 8 2001 \[doi 10.1038%252F35086012\]](file:///C:/Users/micha/Downloads/Nature%20Reviews%20Neuroscience%20Volume%202%20issue%208%202001%20%5Bdoi%2010.1038%252F35086012%5D%20Salinas,%20Emilio%3B%20Sejnowski,%20Terrence%20J.%20--%20CORRELATED%20NEURONAL%20ACTIVITY%20AND%20THE%20FLOW%20OF%20NEURAL%20) Salinas, Emilio%3B Sejnowski, Terrence J. -- CORRELATED NEURONAL ACTIVITY AND THE FLOW OF NEURAL [Accessed March 13, 2017].
- Sanchez-Vives M V., McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3:1027–1034 Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/79848> [Accessed April 19, 2017].
- Sato TK, Hausser M, Carandini M (2014) Distal connectivity causes summation and division across mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 17:30–32 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24241394>.
- Sato TK, Nauhaus I, Carandini M (2012) Traveling Waves in Visual Cortex. *Neuron* 75:218–229 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.029> [Accessed April 19, 2017].
- Sato TR, Svoboda K (2010) The functional properties of barrel cortex neurons projecting to the primary motor cortex. *J Neurosci* 30:4256–4260 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335461>.
- Schoenenberger P, Schärer Y-PZ, Oertner TG (2011) Channelrhodopsin as a tool to investigate synaptic transmission and plasticity. *Exp Physiol* 96:34–39 Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2009.051219> [Accessed March 7, 2017].
- Shao YR, Isett BR, Miyashita T, Chung J, Pourzia O, Gasperini RJ, Feldman DE (2013) Plasticity of Recurrent L2/3 Inhibition and Gamma Oscillations by Whisker Experience. *Neuron* 80:210–222 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.026>.
- Shepherd GM, Svoboda K (2005) Laminar and Columnar Organization of Ascending Excitatory Projections to Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Rat Barrel Cortex. *J Neurosci* 25.

Bibliographie

- Shepherd GMG, Stepanyants A, Bureau I, Chklovskii D, Svoboda K (2005) Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nat Neurosci* 8:782–790 Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn1447> [Accessed March 30, 2017].
- Simons D (1978) Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41:798–820 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/660231>.
- Simons D, Carvell GE (1989) Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J Neurophysiol* 61:311–330 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2918357>.
- Spillmann L (2014) Receptive fields of visual neurons: The early years. *Perception* 43:1145–1176.
- Staiger JF, Flaggmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kötter R, Luhmann HJ (2004) Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb Cortex* 14:690–701 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054049> [Accessed January 2, 2017].
- Steriade M (2004) Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5:121–134 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735115>.
- Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K (2010) A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics* 95:306–311 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088875431000039X> [Accessed March 14, 2017].
- Thomson AM (2010) Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat* 4:13 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20556241>.
- Thomson AM, Bannister a P, Mercer A, Morris OT (2002) Target and temporal pattern selection at neocortical synapses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1781–1791.
- Thorpe S, Fize D, Marlot C (1996) Speed of processing in the human visual system. *Nature* 381:520–522 Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/381520a0> [Accessed March 13, 2017].
- Van der Loos H, Woolsey TA (1973) Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* (80-) 179:395–398 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4682966>.
- Veinante P, Deschenes M (1999) Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J Neurosci* 19:5085–5095 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366641>.
- Veinante P, Jacquin MF, Deschenes M (2000a) Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol* 420:233–243 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753309>.
- Veinante P, Lavallee P, Deschenes M (2000b) Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J Comp Neurol* 424:197–204 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906697>.

Bibliographie

- Vinck M, Batista-Brito R, Knoblich U, Cardin JA (2015) Arousal and Locomotion Make Distinct Contributions to Cortical Activity Patterns and Visual Encoding. *Neuron* 86:740–754 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425590/pdf/nihms673066.pdf> [Accessed March 14, 2017].
- Von Heimendahl M, Itskov PM, Arabzadeh E, Diamond ME (2007) Neuronal activity in rat barrel cortex underlying texture discrimination. *PLoS Biol* 5:2696–2708.
- Wilent WB, Contreras D (2004) Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J Neurosci* 24:3985–3998 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102914>.
- Wilent WB, Contreras D (2005) Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 8:1364–1370 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158064>.
- Wilson NR, Runyan CA, Wang FL, Sur M (2012) Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* 488:343–348 Available at: <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v488/n7411/full/nature11347.html> [Accessed May 13, 2015].
- Witten IB, Lin S-C, Brodsky M, Prakash R, Diester I, Anikeeva P, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2010) Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330:1677–1681 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3142356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Womelsdorf T, Fries P, Mitra PP, Desimone R (2006) Gamma-band synchronization in visual cortex predicts speed of change detection. *Nature* 439:733–736 Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature04258> [Accessed March 31, 2017].
- Woolsey TA, Van der Loos H (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* 17:205–242 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4904874>.
- Yamashita T, Pala A, Pedrido L, Kremer Y, Welker E, Petersen CC (2013) Membrane potential dynamics of neocortical projection neurons driving target-specific signals. *Neuron* 80:1477–1490 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627313010325> [Accessed February 25, 2015].
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71:9–34 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745635>.
- Zhang ZW, Deschênes M (1997) Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. *J Neurosci* 17:6365–6379.

Liste des figures

Figure 1 : Courbes représentatives des fonctions de transfert ou «courbe de gain» théoriques d'un neurone.....	12
Figure 2 : La direction des mouvements est encodée dans le cortex moteur par le patron d'activité d'une population de neurones.	14
Figure 3 : Dessins de Santiago Ramon y Cajal.....	15
Figure 4 : Sélectivité à l'orientation et à la direction des neurones « simple cells » du cortex visuel du chat.	18
Figure 5 : La structure spatiale des réponses des neurones du cortex visuel révèle une organisation tangentielle du cortex visuel primaire en colonnes de sélectivité à l'orientation.....	17
Figure 6 : Reconstructions anatomiques de différents neurones corticaux de la couche 4 et de leurs afférences.	21
Figure 7 : Reconstruction anatomique d'un neurone pyramidal des couches 2/3 de type « complex cells ».....	22
Figure 8 : Reconstructions anatomiques de deux neurones corticaux de la couche 5 et de la couche 6.....	23
Figure 9 : Modèle canonique de la connectivité corticale.	24
Figure 10 : Schéma du système somatosensoriel du rongeur.....	27
Figure 11 : Principales morphologies des neurones corticaux associées aux types de neurotransmetteurs libérés.....	29
Figure 12 : Schéma des connexions corticales inhibitrices des trois principales classes d'interneurones.	30
Figure 13 : Les 4 grandes classes électrophysiologiques des neurones corticaux.	32
Figure 14 : Différentes fréquences de connexions monosynaptiques entre des neurones pyramidaux de la couche 5.....	36
Figure 15 : Matrices de connectivité corticale au sein de la colonne C2 du cortex somesthésique primaire de la souris.	38
Figure 16 : Caractéristiques des réponses sensorielles aux stimulations de différentes vibrisses au niveau des neurones de la couche 4 du cortex somesthésique.	40
Figure 17 : Les réponses sensorielles sont sous-tendues par l'activation de conductances excitatrices et inhibitrices au niveau des neurones corticaux.....	41
Figure 18 : L'amplitude des réponses sensorielles sous- et supraliminaire augmente avec la vitesse des stimuli sensoriels.	42
Figure 19 : Sélectivité à la direction d'un neurone de la couche 4.	43
Figure 20 : Mouvements vibratiles des vibrisses au contact d'une surface lisse ou rugueuse.....	45
Figure 21 : Adaptation des réponses sensorielles des neurones thalamiques et corticaux, à différentes fréquences de stimulations.....	46
Figure 22 : Effets de l'adaptation sur la taille des champs récepteurs et sur les performances cognitives du rat.	48
Figure 23 : Latences des réponses sensorielles des neurones corticaux des différentes couches.....	49
Figure 24 : Les connexions monosynaptiques VPM-L5 sensorielles sont fonctionnelles.	51
Figure 25 : L'inactivation pharmacologique de la couche 4 n'entraîne pas de modifications des réponses sensorielles dans la couche 5.	52
Figure 26 : Représentation schématique du modèle canonique et du modèle proposé par Constantinople & Bruno.....	53
Figure 27 : Structure et propriétés de la ChR2.	57
Figure 28 : Activité neuronale évoquée par la photo-stimulation de la ChR2, exprimée spécifiquement dans les interneurones à PV.....	58
Figure 29 : Effet de la photo-stimulation d'un neurone exprimant l'Arch-3.	60
Figure 30 : Représentation schématique de la technique de transgénèse reposant sur les chromosomes bactériens artificiels.	62
Figure 31 : Expression spécifique de la ChR2-YFP dans les neurones qui projettent vers le cortex auditif droit de la souris, via l'injection des virus rétrogrades de type HSV.....	63
Figure 32 : Principe général de l'électroporation in utero.	65
Figure 33 : Effets de la manipulation bidirectionnelle des interneurones PV exprimant soit la ChR2 soit l'Arch, sur les réponses des cellules pyramidales à des stimuli visuels de différents contrastes.	68
Figure 34 : Effets de la stimulation des interneurones PV ou SOM exprimant la ChR2 sur les réponses sensorielles des neurones pyramidaux..	70
Figure 35 : Effets de la stimulation des interneurones PV ou SOM exprimant la ChR2 sur les réponses à des stimuli visuels de contrastes croissants.....	71
Figure 36 : La couche 6 module de manière bidirectionnelle les réponses sensorielles de la couche 5, sans altérer la sélectivité à la direction.	73
Figure 37 : Effets bidirectionnels de la manipulation de l'activité des neurones excitateurs de la couche 4 sur les réponses sensorielles des couches 2/3 et 5.....	75
Figure 38 : Modulation du gain des neurones corticaux par des dépolarisations toniques ou par l'ajout de conductances.	119
Figure 39 : Effet théorique de la photo-suppression des couches 2/3 sur la sélectivité à la direction des neurones infragranulaires du cortex somesthésique.	121

Liste des figures

Figure 40 : Potentiels effets de la modulation des relations entrée-sortie sur les capacités à détecter ou discriminer des stimuli.....	123
Figure 41 : Comparaison des activités des neurones des couches profondes en réponses aux stimulations sensorielles et à la photo-activation des couches 2/3 à 30 Hz.	125
Figure 42 : Caractéristiques des réponses sensorielles en fonction des rapports signaux-sur-bruits.....	126
Figure 43 : Réponses sensorielles supraliminaires à la déflexion de la vibrisse principale de neurones des différentes couches corticales.	128

Résumé

La perception consciente du monde extérieur repose sur la coordination spatiotemporelle de l'activité des neurones corticaux. L'une des caractéristiques principales des aires corticales primaires chez les mammifères est leur organisation laminaire en six couches et tangentielle en colonnes fonctionnelles au sein desquelles les neurones partagent les mêmes champs récepteurs.

A partir de données anatomiques, un modèle dit canonique de traitement des informations sensorielles au travers des différentes couches des colonnes corticales a été proposé. Le modèle suppose que l'information sensorielle est traitée de façon sérielle. D'abord au niveau de la couche IV, cible principale des afférences thalamiques. Ensuite au niveau des couches II/III superficielles qui sont fortement innervées par les neurones excitateurs de la couche IV. Et enfin par les neurones des couches profondes, V et VI, qui sont innervés par les cellules pyramidales glutamatergiques des couches superficielles. Les neurones pyramidaux de la couche V constituant la principale sortie du néocortex.

Toutefois, il a récemment été montré que les neurones des couches profondes reçoivent également des informations sensorielles directement par des afférences thalamiques, ce qui pose la question du ou des rôles de la connectivité interlaminaire dans le traitement sensoriel opéré au sein des colonnes corticales.

Afin d'aborder cette problématique, j'ai tiré profit de la technique d'électroporation *in utero* qui permet d'exprimer spécifiquement des protéines photo-activables dans les cellules pyramidales des couches II/III du cortex somesthésique primaire de la souris recevant des informations sensorielles en provenance des vibrisses ; un modèle d'étude très populaire en neurophysiologie de la perception.

Ainsi, j'ai pu évaluer l'impact de manipulations spécifiques et temporellement précises de l'activité des neurones excitateurs des couches superficielles dans le déterminisme des réponses sensorielles des neurones de la couche V évoquées par la stimulation de vibrisses.

En procédant à des enregistrements unitaires multi-sites au sein de différentes couches corticales à la fois chez des animaux anesthésiés et éveillés, j'ai montré que le recrutement des neurones pyramidaux des couches II/III permet d'amplifier les réponses sensorielles des neurones de la couche V. Par ailleurs, l'analyse de ce phénomène d'amplification en fonction de l'intensité des stimulations sensorielles indique que la connectivité interlaminaire joue un rôle majeur dans la modulation du gain des neurones de la couche de sortie du cortex.