



HAL
open science

Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux

Benjamin Le Gac

► **To cite this version:**

Benjamin Le Gac. Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS125 . tel-03428981

HAL Id: tel-03428981

<https://theses.hal.science/tel-03428981>

Submitted on 15 Nov 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Cerveau Cognition Comportement (ED3C) - ED n°158

Neurosciences Paris Seine / Réseaux synaptique et neuroénergétique

Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux

Par Benjamin Le Gac

Thèse de doctorat de neurosciences

Dirigée par Bruno Cauli

Présentée et soutenue publiquement le 13/08/2021

Devant un jury composé de :

M ^{me} ALI Carine	Professeur des universités	Rapporteur
M ^{me} GIROUARD Hélène	Professeur des universités	Rapporteur
M ^r CHARPAK Serge	Directeur de recherche	Examineur
M ^r GURDEN Hirac	Directeur de recherche	Examineur
M ^r CAULI Bruno	Directeur de recherche	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Hélène Girouard et Carine Ali d'avoir accepté d'être les rapporteurs et de prendre du temps pour la lecture et l'évaluation de mon travail de doctorat. Je remercie aussi Hiram Gurden et Serge Charpak d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse pour examiner ce travail. C'est un réel plaisir et honneur pour moi que vous fassiez partie de mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier Marie-Claude Potier et Hiram Gurden d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Leurs conseils m'ont énormément aidé à développer et à diriger mon projet doctoral dans la bonne direction.

Je remercie la Fondation pour la Recherche sur Alzheimer pour m'avoir fait confiance et accordé une bourse et une prolongation de thèse pour réaliser l'ensemble de ces travaux.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Hervé Chneiweiss pour m'avoir accepté dans le laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à Alain Trembleau pour son travail de directeur de l'ED3C et nous permettre en tant que doctorants de nous former aux métiers de la recherche dans le meilleur cadre possible.

Je remercie tout particulièrement Bruno Cauli, mon directeur de thèse, qui a supervisé et dirigé mon travail depuis mon stage de M2. Sur le plan professionnel, tu m'as tellement appris que ce soit au niveau théorique que pratique. C'est tout ce dont je rêvais pour une thèse de pouvoir apprendre chaque jour autant dans le domaine des neurosciences qu'en-dehors. La confiance que tu m'as accordée tout le long de ces années de thèse m'a tellement permis d'apprendre dans la recherche et de me développer dans ce milieu. Humainement, ça a été un plaisir de pouvoir travailler avec toi, de rigoler de tout et n'importe quoi comme de vidéos de m  talliciens foireux ou de conneries sur les réseaux. Tu as toujours été là pour m'aider à ce que je puisse me sentir bien au laboratoire et à Paris. En plus d'être un directeur de thèse et un scientifique hors-pair pour moi, tu es devenu un véritable ami !

Je remercie Bertrand Lambolez pour ton accueil dans l'équipe, pour tous tes conseils tout le long de ma thèse qui m'ont beaucoup aidé. Toutes les discussions que l'on a eues au laboratoire m'ont permis d'avancer dans la réflexion de mon travail et aussi de beaucoup rigoler. Je tiens également à remercier l'ensemble de membres de l'équipe

Merci    Sandrine Picaud pour ton aide tout au long de mon passage au labo. C'était tellement agréable de pouvoir travailler et d'apprendre plein de techniques avec toi. De plus, c'était trop cool de pouvoir discuter de tout et n'importe quoi tout le temps ! Merci    Ludovic Tricoire d'avoir été à l'écoute tout le long de la thèse pour toutes mes questions bêtes et de toujours y avoir une réponse claire. Fais attention, je ne serai plus là pour te signaler que tu as oublié ton café ! Merci    Régine Hepp,    Laila Gasmi et à Ivan Cohen pour votre gentillesse et votre bonne humeur au quotidien. C'est qui a fait que je me suis toujours senti bien à venir travailler au laboratoire. Merci    Agnès Bonnot pour son soutien envers les étudiants. Merci    Boubacar Mohamed pour toutes les discussions super intéressantes sur la recherche et la médecine. C'était trop agréable de pouvoir partager avec toi ce domaine de recherche du couplage neurovasculaire et d'avoir des retours sur mon travail. Merci    Réda El Mahzoum pour son enthousiasme communicatif au labo et sa bonne humeur. Merci Esther Belzic de reprendre une partie de mon projet et de me faire bien rire au labo même si tu te fous un peu trop moi !

Je remercie aussi les anciens de l'équipe. Tout d'abord, l'équipe JoVE : Gabrielle Devienne, grâce à toi, j'ai pu me sentir au bureau comme chez moi directement. On a tellement pu rigoler et tu as toujours été là pour m'aider pour tout mon début de thèse. ありがとうございました。Sensei ! Merci Juliette Piquet pour m'avoir accepté dans ton dos lorsque je bossais sur le poste. Tu m'as tellement aidé pour tout ce qui était théorie et pratique sur mon poste. Tu t'es bien moqué de moi pour mes petites erreurs de prononciation mais ne t'inquiètes pas, je me vengerai !

Je remercie l'ensemble des personnes des autres équipes du B5. Philippe Faure, pour ses conseils avisés sur mon travail depuis le M2 et de me laisser venir l'embêter lui et toute son équipe quand je viens me promener de leur côté de couloir. Alexandre Mourot, collègue de réflexe photo-sternutatoire, pour toutes les discussions scientifiques ou non que l'on a pu avoir tout le long de ma thèse. Grâce à toi, j'ai pu faire un peu de bière (même si elle puait franchement des pieds haha). Jérémie Naudé, pour les conseils que tu as pu me filer pour les statistiques ou autre et aussi pour tous les débats que l'on a eus sur les films (Interstellar est le meilleur film qui existe). Steve Didienne, pour m'avoir aidé à faire des petites constructions 3D et me faire toujours autant rire à chaque fois que l'on discute ensemble. Elise Bousseynol, ma collègue de labo depuis le début, on en aura chié ensemble et on commence à en voir la fin ! C'était tellement cool d'avoir pu se soutenir et rigoler que ça soit au labo ou en dehors. Sophie Fayad, ancienne collaboratrice de choc, qui a dû me supporter en train de faire du patch-clamp, ce qui n'est pas une mince affaire. Merci aussi pour toutes ces tartes au citron qui m'ont grandement aidé dans cette aventure. Tinaïg Le Borgne, je te considère un peu comme une traîtresse depuis que tu as changé d'équipe mais ça va, tu es parti dans une bonne équipe. De toute façon en tant que bretons, ça fait que l'on a bien conquis ce B5 et on règne un peu en maître, j'ai envie de dire. Merci aussi pour tes corrections pour ce manuscrit et surtout d'avoir supporté tous mes gifs de chatons. Maxime Côme, de me faire toujours marrer et d'avoir subi tellement de vanes de ma part mais c'est de bonne guerre. En vrai, je l'avoue ici mais j'aime bien chanter au concert aussi même si je t'ai dit le contraire. Il fallait que je le dise. Eléonore Vicq, avec ton rire communicatif qui apporte de la joie et surtout des pleurs de ta part. Robin Justo, mangeur de pâté invétéré, ça a été un plaisir de pouvoir te retrouver par la suite au labo après t'avoir connu en dehors et d'avoir pu partager un petit bout de chemin au labo. Bernadette Hanneuse, de m'avoir apporté ton aide tout du long. Tu es tellement essentielle pour faire tourner ce labo. Je remercie aussi Fabio Marti, Lauren Reynolds et Nicolas Torquet avec qui j'ai pu papoter de temps en temps au labo.

Je remercie aussi les anciens de cette équipe par ordre de départ. Romain Durand-de Cuttoli pour ton aide lors de mon arrivée au labo et tout le soutien et les bonnes rigolades que tu as pu m'apporter. La meilleure, Sarah Mondoloni, qui a été tellement importante pour me sentir bien au labo et à Paris. Nos discussions scientifiques m'ont tellement permis d'avancer et tu as été un exemple de doctorat pour moi. Je sais que tu vas plus te sentir après avoir lu ça donc redescends un peu car tu es quand même un peu chiant. Merci d'avoir été là pour moi lors de cette thèse. Claire Nguyen, de m'avoir communiqué ta joie et ton énergie tous les jours au labo.

Je remercie Nathalie Leresche et Régis Lambert pour m'avoir apporté des conseils tout le long de mon doctorat et de m'avoir fait confiance lors de notre collaboration. Ça été un réel plaisir de pouvoir travailler et de pouvoir discuter de science avec vous. Je remercie aussi Éric Schwartz pour toutes nos petites discussions sportives et d'avoir autant apprécié mes différents tee-shirts.

Je tiens aussi à remercier les gens du B2. Dongdong Li, pour ton aide sur mon manuscrit et sur tes avis précieux sur mon travail de thèse. Cuong Pham, pour m'avoir accompagné sur la passerelle de nombreuses minutes et d'avoir été au final mon binôme depuis nos réunions ANR. On se sera bien marrer dans toutes nos sorties intra- et extra-IBPS. Ça a été tellement cool de pouvoir partager tous ces moments avec toi, ça va bien me manquer. Hervé Arulkandarajah, on se fait un petit pile ou face pour savoir si j'écris ces remerciements ? Je sais que je vais gagner quoi qu'il arrive (pas comme le PSG en champions league). Nos discussions scientifiques ont été souvent tellement intéressantes pour mon projet et on aura bien rigolé quand même. On aura formé quand même un bon trio pour faire n'importe quoi avec Cuong et toi. Agathe Lafont, pour toujours être partante pour faire des conneries aussi avec nous et de m'avoir bien fait rigoler depuis que tu es arrivée. Hervé Le Corronc, le breton par excellence sur qui, on devrait tous prendre exemple. Ton aide a été tellement précieuse pour ton savoir sur absolument et ce qui est toujours génial pour lancer des discussions géniales. Je remercie Anne-Claire Compagnion, pour tout ce que tu as pu m'apporter ces derniers temps. Je ne sais pas comment j'aurai fait sans toi pour finir cette thèse. Merci, d'être aussi présente pour moi et de me soutenir et de m'écouter. Ton aide sur ce manuscrit a été aussi tellement importante pour moi et tellement juste. Je crois que je vais enfin être libéré pour venir faire un tour en Suisse et faire des parties de DST. Gif chaton & Gif chiot.

Je remercie aussi Camille de Almeida pour m'avoir soutenu toute ma thèse et pour toute la gentillesse que tu as pu m'apporter. Salima Messaoudi, pour être toujours aussi souriante et apporter un peu joie dans le labo.

Je tiens à remercier tous mes copains de master qui ont toujours été là pour moi à Paris. Le groupe des besthous : Loïc Poiraudreau, le petit ours, tu as toujours été une belle personne et tu m'as permis de pouvoir me sentir comme à la maison à Paris. J'ai toujours adoré squatter chez toi et que l'on discute de tout et n'importe quoi. Tu as toujours répondu présent directement pour me filer un coup de main, je suis tellement heureux d'être pote avec un gars comme toi. Mélanie Leboeuf, ta joie et ta bonne humeur m'ont fait toujours avancer plus loin depuis que je t'ai rencontré en cours d'anglais. Je continuerai de te protéger en balançant des pokéballs sur les relous, t'inquiète. Théo Vanneau, le premier gars rencontré à Paris juste parce que j'étais assis tout seul dans l'amphi. Grâce à toi, dès le jour 1 à Paris, ça s'est parfaitement passé et on n'aura pas cessé de bien rigoler et faire de la merde depuis. Erwann Pain, merci de me supporter depuis le premier jour de TP qui a dû être compliqué pour toi. Je suis tellement pressé que l'on reparte à Noirmout' ensemble. Je remercie Yasmine qui a toujours pris le temps de s'inquiéter de comment j'allais tout mon séjour à Paris et pour m'avoir fait tellement rire avec ton humour que tout le monde ne peut pas comprendre.

Je remercie aussi tous mes potes bretons. Yoann Defay, depuis le temps que l'on se connaît, j'ai toujours autant rigolé avec toi, surtout quand je te fous des branlées à FIFA. Tu m'accueilleras toujours à bras ouverts et tu m'as soutenu depuis le début. Les copains de la bande de Gotrek et surtout, Julien Louis le meilleur MJ qui m'a sûrement vu quasiment tous les jours à un moment sur Paris et sur son balcon. Tu m'as bien permis de me vider la tête quand j'en avais besoin. Je remercie tous les copains du Hand, Matthias, Benjamin, Raffi, Samy, Sylvain et les autres avec qui j'ai pu partager tellement de bons moments sur le terrain et en dehors.

Je tiens à remercier toute ma famille pour qui j'ai fait cette thèse et qui m'ont toujours soutenu sans retenu dans ce projet. Je remercie particulièrement, Soizic et Gwen de m'avoir accueilli

à Paris et de m'avoir aidé à m'installer ici. Vous avez toujours été là pour m'aider même en plein milieu de la nuit et je ne sais pas comment je pourrai vous remercier pour ça. Mireille, pour tout ce que tu as fait pour moi toutes ces années. Tu as toujours été présente pour moi. Toutes les discussions que j'ai eues avec toi m'ont toujours fait le plus grand bien. Chloé, ma petite sœur pour qui je ferai n'importe quoi et qui m'apporte toujours autant de joie. Tu as toujours su être là pour moi rien que pour s'échanger quelques messages mais ça m'a toujours suffi pour continuer. Maman, de m'avoir fait aimer les sciences depuis que je suis tout petit et voilà où j'en suis maintenant. Tu as toujours été là pour me soutenir quoi qu'il arrive et je t'en remercie de tout mon cœur. Je vous aime.

Je garde le meilleur pour la fin. Merci papa pour tout ce que tu as fait pour moi, tout le temps et sans réfléchir pour que je puisse réussir mes études et cette thèse. Je n'aurai jamais pu faire ce doctorat sans toi et tout ce travail, je l'ai fait pour toi. Tu as le cœur sur la main et j'espère pouvoir retransmettre ça en essayant de devenir chercheur et de pouvoir un jour espérer aider le plus de personne possible. Jamais je ne te remercierai assez. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	3
Listes des publications et des présentations	4
Résumé	5
Introduction	7
Le néocortex vu sous différents angles	9
Regard anatomique sur le néocortex	9
Regard fonctionnel sur le néocortex	10
L'organisation laminaire du cortex cérébral	12
L'organisation columnaire du néocortex	14
L'unité neuro-glio-vasculaire	17
Le neurone : une cellule spécialisée et diversifiée	17
Les neurones glutamatergiques	18
Neurotransmetteur	18
Morphologie	19
Les neurones pyramidaux	19
Les neurones étoilés épineux	20
Electrophysiologie	20
Les neurones GABAergiques	22
Neurotransmetteur	22
Morphologie	22
Electrophysiologie	23
Les cellules gliales	26
Les astrocytes	26
Morphologie	26
Rôle physiopathologique	27
Les oligodendrocytes	28
La microglie	28
Le réseau vasculaire	29
Le sang, vecteur d'énergie	30
La perfusion cérébrale	30
La vasculature du néocortex	31
La structure des vaisseaux corticaux	34

L'endothélium _____	34
Les cellules musculaires lisses _____	35
Les péricytes _____	35
L'unité neuro-glio-vasculaire _____	36
La régulation du flux sanguin _____	36
La loi de Poiseuille _____	36
L'influence du calcium sur l'état contractile _____	37
La régulation par les nucléotides cycliques _____	38
L'autorégulation cérébrale _____	39
L'autorégulation par le réflexe myogénique _____	39
L'autorégulation dépendante de l'endothélium _____	40
La régulation extrinsèque de la perfusion sanguine corticale _____	40
La régulation intrinsèque de la perfusion sanguine corticale _____	42
Le couplage neurovasculaire _____	44
La naissance du concept de couplage neurovasculaire _____	44
Les bases du couplage neurovasculaire _____	46
L'imagerie mésoscopique du couplage neurovasculaire _____	48
La tomographie par émission de positons _____	49
L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle _____	50
L'imagerie spectroscopique fonctionnelle _____	50
L'imagerie par ultrasons fonctionnelle _____	51
L'imagerie microscopique du couplage neurovasculaire _____	51
Les préparations <i>ex vivo</i> de tranches de cerveau et de rétines isolées _____	51
Les préparations <i>in vivo</i> utilisant la microscopie biphotonique _____	52
Les différentes hypothèses des mécanismes du couplage neurovasculaire _____	53
L'hypothèse rétrograde _____	54
L'hypothèse antérograde _____	55
La régulation de la perfusion sanguine par les neurones _____	55
La régulation de la perfusion sanguine par les astrocytes _____	57
Le rôle de l'endothélium _____	58
La corrélation entre l'activité cérébrale et la perfusion sanguine _____	60
Problématique _____	63
Présentation des articles _____	68
Bidirectional control of the neurovascular coupling by pyramidal neurons _____	69
Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp__	107

Discussion et perspectives	121
Discussion des résultats	123
Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux	123
L'induction de vasoconstrictions par les neurones pyramidaux via la PGE2	126
Le recrutement neuronal lors des vasoconstrictions	127
Perspectives	128
La transposition de l'étude à des préparations <i>in vivo</i>	129
Le couplage neurovasculaire et le métabolisme	129
Modification du couplage neurovasculaire exercé par les neurones pyramidaux au cours du vieillissement et dans différentes conditions pathologiques	132
Conclusion	137
Bibliographie	141
Travaux annexes	161
Lactate is a major energy substrate for cortical neurons and enhances their firing activity	163
Rôle du canal calcique à bas-seuil Cav3.2 dans les mécanismes centraux des douleurs chroniques	231

Liste des abréviations

2-DG : 2-désoxyglucose	GABA : <i>gamma-aminobutyric acid</i> / Acide gamma-aminobutyrique
ADN : Acide désoxyribonucléique	GAD : Glutamate décarboxylase
AHP : <i>Afterhyperpolarisation</i> / Phase d'hyperpolarisation	GFAP : <i>Glial fibrillary acidic protein</i> / Protéine acide fibrillaire gliale
AMPA : <i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique acid</i> / Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique	GLAST : <i>Glutamate aspartate transporter</i> / Transporteur du glutamate et de l'aspartate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	GLT : <i>Glutamate transporter</i> / Transporteur du glutamate
ARNm : Acide ribonucléique messenger	GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
ATP : Adénosine triphosphate	HETE : <i>Hydroxyeicosatetraenoic acid</i> / Acide hydroxyeicosatétraénoïque
Aβ : peptide amyloïde β	IB : <i>Intrinsically bursting</i> / Décharge en bouffée
BOLD : <i>Blood oxygen level dependent</i> / Dépendant du niveau d'oxygène sanguin	IR : Infrarouge
Ca²⁺ : Ion calcium	IRM : imagerie par résonance magnétique
CaM : Calmoduline	IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
Canaux BK : Canaux potassiques de grande conductance sensibles au calcium	K⁺ : Ion potassium
CGRP : <i>Calcitonine gene related peptide</i> / Peptide relié au gène calcitonine	K_{ATP} : Canaux potassiques sensibles à l'ATP
ChR2 : Channelrhodopsine-2	K_{ir} : <i>Inward rectifier potassium channels</i> / Canaux potassiques correcteurs entrants
COX-1 : Cyclooxygénase-1	L : Longueur du vaisseau sanguin
COX-2 : Cyclooxygénase-2	LED : <i>Light-emitting diode</i> / Diode électroluminescente
CSD : <i>Cortical spreading depolarizations</i> / Dépolarisations corticales envahissantes	MAP2 : <i>Microtubule-associated protein 2</i> / Protéine 2 associée aux microtubules
EDHF : <i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i> / Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	MEG : Magnétoencéphalographie
EEG : Electroencéphalographie	mGFP : <i>membrane-bound green fluorescent protein</i> / Protéine fluorescente verte liée à la membrane
EET : <i>epoxyeicosatrienoic acids</i> / Acides époxyeicosatriénoïques	mGluR : <i>Metabotropic glutamate receptor</i> / Récepteur métabotrope du glutamate
EGFP : <i>Enhanced green fluorescent protein</i> / Protéine fluorescente verte	MLC : <i>Myosine light chain</i> / Chaîne légère de la myosine
eNOS : <i>Endothelial Nitric oxide synthase</i> / Monoxyde d'azote synthase endothéliale	MLCK : <i>Myosine light chain kinase</i> / Kinase de la chaîne légère de myosine
EYFP : <i>Enhanced yellow fluorescent protein</i> / Protéine fluorescente jaune	mmHg : millimètre de mercure
FS : <i>Fast-spiking</i> / Décharge à haute fréquence	Na⁺ : Ion sodium
fUS : <i>Functional ultrasound</i> / Ultrasons fonctionnels	

NMDA : *N-methyl-D-aspartic acid*/ Acide N-méthyl-D-aspartique

NO : Nitric oxide/ Monoxyde d'azote

NOS : *Nitric oxide synthase*/ Monoxyde d'azote synthase

NPY : Neuropeptide Y

O₂ : Dioxygène

OG : *Otic ganglions*/ Ganglions otiques (OG)

P : Pression de perfusion

PCR : *Polymerase chain reaction*/ Réaction de polymérisation en chaîne

PGE2 : Prostaglandine E2

PGES : Prostaglandine E2 synthase

PGF2 α : Prostaglandine F2a

PGFS : Prostaglandine F2a synthase

PGI2 : Prostacycline I2

PNS : *Peripheral nervous system*/ Système nerveux périphérique

PV : Parvalbumine

Q : Flux sanguin cérébral

r : rayon interne du vaisseau sanguin

RS : *Regular spiking*/ Décharge habituelle

RT : *Reverse transcription*/ Transcription inverse

SCG : *Superior cervical ganglions*/ Ganglions cervical supérieur

scRT-PCR : *single cell RT-PCR*/ RT-PCR sur cellule unique

SMT : Stimulation magnétique transcrânienne

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SOM : Somatostatine

SPG : *Spheno-palatin ganglions*/ Ganglions sphéno-palatins

SR : *Sarcoplasmique reticulum*/ Réticulum sarcoplasmique

TEP : Tomographie par émission de positons

TG : *Trigeminal ganglions*/ Ganglions trigéminal

tPA : *tissue plasminogen activator*/ Activateur tissulaire du plasminogène

TRP : *Transient receptor potential*/ Potentiel de récepteur transitoire

VDDC : *Voltage-dependent calcium channels*/ canaux calciques voltage-dépendant

VGC : *Voltage gated channels*/ Canaux ouvert par le voltage

VGLUT : *Vesicular glutamate transporter*/Transporteur vésiculaire du glutamate

VIP : *Vasoactive intestinal polypeptide*/ Polypeptide vasoactif intestinal

β^+ : positons

η : Viscosité sanguine

Liste des figures

<i>Figure 1 : Le néocortex est une structure cérébrale délimitée anatomiquement et fonctionnellement.</i>	10
<i>Figure 2 : L'homuncule sensoriel et moteur de Penfield.</i>	12
<i>Figure 3 : Le néocortex est arrangé en couches successives.</i>	13
<i>Figure 4 : Les « tonneaux », une particularité des colonnes du cortex somesthésique des vibrisses de rongeurs.</i>	15
<i>Figure 5 : Les neurones pyramidaux sont les principaux neurones glutamatergiques du néocortex.</i>	19
<i>Figure 6 : Les profils de décharges des neurones glutamatergiques et leur localisation.</i>	21
<i>Figure 7 : Les interneurons GABAergiques sont caractérisés par une grande hétérogénéité.</i>	25
<i>Figure 8 : Les astrocytes sont des cellules gliales ramifiées.</i>	27
<i>Figure 9 : L'oligodendrocyte est une cellule gliale myélinisante.</i>	28
<i>Figure 10 : Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes du SNC.</i>	29
<i>Figure 11 : Du cœur au cortex somesthésique primaire.</i>	31
<i>Figure 12 : La vasculature néocorticale.</i>	32
<i>Figure 13 : Des cellules musculaires lisses entourent les artérioles et les veinules.</i>	33
<i>Figure 14 : Représentation schématique de la paroi d'une artériole cérébrale</i>	34
<i>Figure 15 : Les péricytes sont les cellules contractiles des capillaires.</i>	35
<i>Figure 16 : Représentation schématique de l'unité neuro-glio-vasculaire.</i>	36
<i>Figure 17 : Représentation de la loi de Poiseuille.</i>	37
<i>Figure 18 : La régulation de l'état contractile des cellules musculaires lisses.</i>	38
<i>Figure 19 : Représentation schématique des afférences nerveuses reçues par le système vasculaire cortical.</i>	41
<i>Figure 20 : Les débuts de l'étude du fonctionnement cérébral au travers du couplage neurovasculaire par Angelo Mosso.</i>	44
<i>Figure 21 : Observation d'un couplage neurovasculaire par Roy et Sherrington.</i>	45
<i>Figure 22 : La réponse vasculaire à l'activité neuronale.</i>	47
<i>Figure 23 : La résolution spatio-temporelle des principales techniques utilisées en neurosciences.</i>	48
<i>Figure 24 : L'imagerie cérébrale fonctionnelle grâce à la tomographie par émission de positons.</i>	49
<i>Figure 25 : Exemple d'une préparation ex vivo d'une tranche de néocortex de souris.</i>	52
<i>Figure 26 : La mesure du diamètre luminal et du flux sanguin par microscopie biphotonique.</i>	53
<i>Figure 27 : Les deux hypothèses majeures des mécanismes du couplage neurovasculaire</i>	54
<i>Figure 28 : Les cellules et les messagers vasoactifs impliqués dans l'hyperémie fonctionnelle.</i>	59
<i>Figure 29 : Représentation du poste d'imagerie et d'électrophysiologie utilisé durant le doctorat.</i>	70
<i>Figure 30 : Estimation de l'aire photostimulée.</i>	125
<i>Figure 31 : Le lactate influence la polarité de la réponse neurovasculaire.</i>	131
<i>Figure 32 : Hypothèses d'altération du couplage neurovasculaire contrôlé par les neurones pyramidaux dans la maladie d'Alzheimer.</i>	133
<i>Figure 33 : Induction de dépression corticale envahissante par des photostimulations.</i>	135

Listes des publications et des présentations

Article 1 (en preparation) :

Bidirectional control of the neurovascular coupling by pyramidal neurons

Benjamin Le Gac, Sandrine Picaud, Dongdong Li & Bruno Cauli

Article 2 (publié dans *Journal of Visualized Experiments - JoVE*) :

Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp

Gabrielle Devienne*, Benjamin Le Gac*, Juliette Piquet* & Bruno Cauli

*Contribution de manière égale

Article 3 (en soumission, disponible en préprint) :

Lactate is a major energy substrate for cortical neurons and enhances their firing activity

Anastassios Karagiannis, Thierry Gallopin, Alexandre Lacroix, Fabrice Plaisier, Juliette Piquet, Hélène Geoffroy, Régine Hepp, Jérémie Naudé, Benjamin Le Gac, Richard Egger, Bertrand Lambolez, Dongdong Li, Jean Rossier, Jochen F. Staiger, Hiromi Imamura, Susumu Seino, Jochen Roeper & Bruno Cauli.

Article 4 (en preparation) :

Rôle du canal calcique à bas-seuil Cav3.2 dans les mécanismes centraux des douleurs chroniques

Présentations orales :

Bidirectional control of neurovascular coupling by pyramidal cells

Benjamin Le Gac & Bruno Cauli

- Réunion annuelle de la Société d'étude des interfaces Sang Cerveau (SEISC) – 9 novembre 2018 (en français)
- Webinaire de la réunion annuelle de la Société d'étude des interfaces Sang Cerveau (SEISC) – 21 mars 2021 (en anglais)

Poster :

Bidirectional control of neurovascular coupling by pyramidal cells

Benjamin Le Gac & Bruno Cauli

- Brain & Brain PET 2019, Yokohama, Japon – 4 au 7 juillet 2019

Résumé

Le couplage neurovasculaire, le lien étroit entre l'activité neuronale et le flux sanguin cérébral, est essentiel au fonctionnement et à l'intégrité du cerveau. Les variations hémodynamiques sont étroitement corrélées à l'activité neuronale sur une large gamme d'oscillations rythmiques cérébrales qui reflètent en grande partie l'activité synchrone des neurones pyramidaux. Certains neurones pyramidaux expriment la cyclooxygénase-2 (COX-2) et sont responsables d'environ la moitié de la réponse neurovasculaire dilatatrice en libérant de la prostaglandine E2 (PGE2). Nous avons cherché à déterminer les régimes d'activité des neurones pyramidaux qui déclenchent des réponses neurovasculaires vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et d'en préciser les mécanismes sous-jacents.

En utilisant des stimulations optogénétiques sélectives dans des tranches corticales de souris, nous avons montré que ces neurones déclenchent des vasodilatations à basse fréquence et, étonnamment, des vasoconstrictions à haute fréquence. Ces photostimulations induisent également une augmentation de calcium intracellulaire, un prérequis à la synthèse et/ou la libération de messagers vasoactifs d'autant plus importante que les fréquences sont élevées. Ces données confirment les propriétés vasodilatatrices des neurones pyramidaux observées précédemment, mais révèlent aussi des propriétés vasoconstrictrices dont les mécanismes n'ont pas été étudiés. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces vasoconstrictions. Plusieurs prostaglandines sont vasoconstrictrices comme la PGE2 à forte concentration ou la prostaglandine F2 α (PGF2 α). L'analyse par RT-PCR sur cellule unique a révélé que les neurones pyramidaux expriment les enzymes nécessaires à la synthèse de la PGE2 et de la PGF2 α . L'analyse pharmacologique des réponses neurovasculaires montre que les vasoconstrictions sont dépendantes de l'activité neuronale et de la COX-2 et nécessitent l'activation des récepteurs EP1 et EP3 de la PGE2 mais pas ceux de la PGF2 α . Elles impliquent également une libération du neuropeptide Y (NPY) et l'activation de son récepteur Y1 mais pas la libération de messagers d'origine astrocytaire. L'application exogène de PGE2 peut induire de façon dose-dépendante à la fois une vasoconstriction et une vasodilatation dans une moindre mesure. Ces résultats indiquent que les neurones pyramidaux et la PGE2 qu'ils produisent pourraient jouer un rôle plus complexe dans le couplage neurovasculaire qu'on ne le pensait auparavant.

Introduction

Le néocortex vu sous différents angles

Regard anatomique sur le néocortex

L'environnement extérieur et notre milieu intérieur sont perçus et intégrés par le système nerveux pour permettre une représentation et une adaptation de ce qui nous entoure et de notre corps. Par nos sens, nous identifions les stimuli physiques grâce à la vision, l'audition, la somesthésie et la proprioception ou chimiques, et ainsi nous permettent des réactions appropriées à ces informations. Ce système nerveux est divisé en deux parties selon leurs structures : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNP est lui composé des nerfs et des ganglions nerveux en périphérie du SNC et assure des fonctions vitales telles que le rythme cardiaque, la pression artérielle ou encore le contrôle des viscères. Il commande aussi les mouvements et la position du corps et permet de percevoir l'environnement par les différents sens. Au niveau anatomique, le SNC est composé de la moelle épinière et de l'encéphale. Le SNC est enveloppé et protégé par les méninges et le crâne ou les vertèbres. Les méninges sont trois membranes comprenant, de la plus externe à la plus interne, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Le liquide céphalorachidien circule au niveau de l'espace sous-arachnoïdien situé entre l'arachnoïde et la pie-mère (Jones, 1970; Zhang et al., 1990).

Nous allons nous focaliser sur le néocortex, la partie la plus superficielle qui recouvre les hémisphères cérébraux. Il est apparu récemment au cours de l'évolution avec les mammifères et est le siège des processus sensoriels, moteurs et cognitifs élaborés tels que la conscience, le langage ou encore la pensée abstraite. Il est constitué de la substance grise, riche en cellules et de la substance blanche, plus profonde, formée des fibres myélinisées des neurones de projection. Chez l'être humain et autres mammifères dits gyrencéphaliques, le néocortex est une structure parcourue de sillons ou *sulci* et de circonvolutions appelées *gyri* (Figure 1a). Cette organisation plissée permet d'accroître la surface du néocortex dans le volume délimité par la boîte crânienne. Au contraire, les rats et les souris sont des lissencéphaliques avec un néocortex dépourvu de *sulci* et *gyri*. L'observation anatomique et fonctionnelle du néocortex a permis de le délimiter en lobes cérébraux et en aires corticales que l'on peut retrouver chez les gyrencéphales et les lissencéphales.

Chez l'humain, la fissure longitudinale sépare le néocortex en deux hémisphères qui sont reliés entre eux par le corps calleux. Des sillons corticaux servent de repères pour séparer chacun de ces hémisphères en quatre lobes nommés selon les os du crâne qui les recouvrent. Le sillon central sépare le lobe frontal, lobe le plus rostral, du lobe pariétal. Le lobe temporal est lui situé sous ces deux lobes séparés par le sillon latéral. Le lobe occipital est délimité du lobe pariétal par le sillon pariéto-occipital et est le plus caudal. (Pour plus d'informations, Casillo et al. présente un historique sur le concept de division du cortex cérébral en lobes (Casillo et al., 2020)) (Figure 1b).

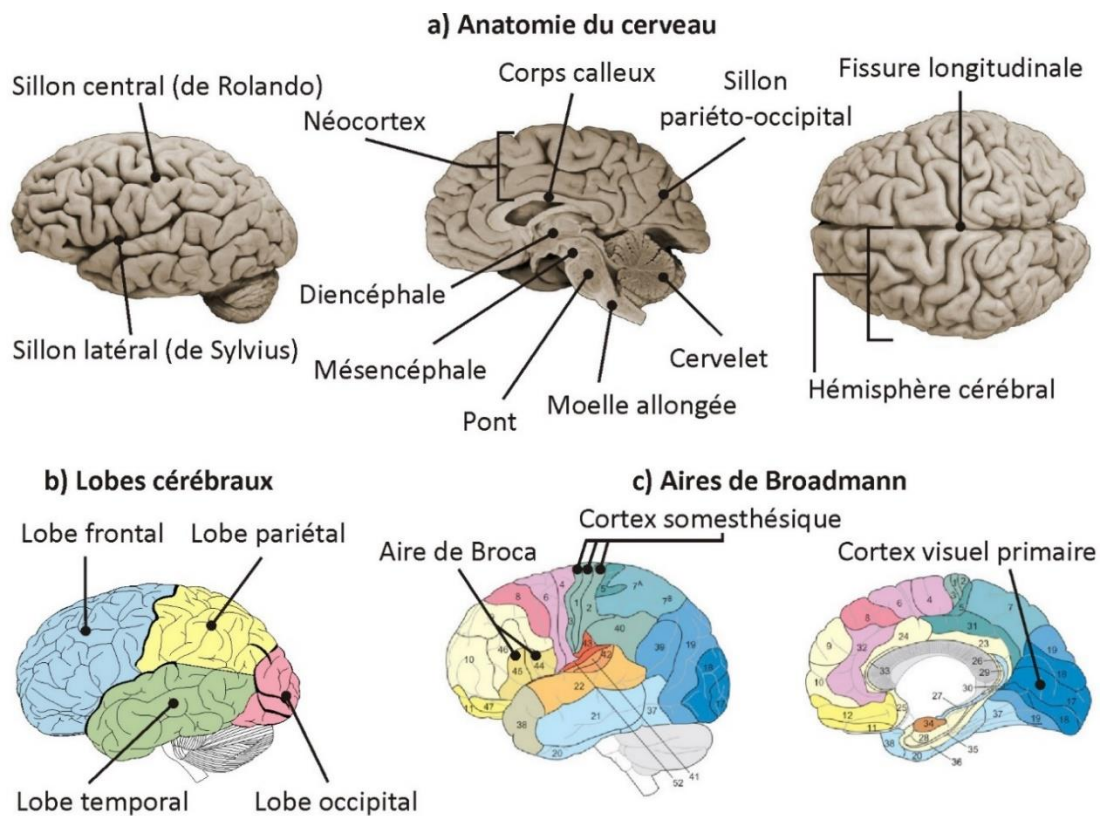


Figure 1 : Le néocortex est une structure cérébrale délimitée anatomiquement et fonctionnellement. a) Des limites anatomiques visibles à la surface du cerveau ont permis (b) de le diviser en 4 lobes externes. c) D'autres subdivisions ont ensuite été possibles par la classification de Brodmann prenant en compte l'aspect histologique et fonctionnel. Adaptés de (a) *Neuroscience 6ème édition*, (b) *Gray's Anatomy* et (c) *Fundamentals of Cognitive Neuroscience (Second Edition)*.

Regard fonctionnel sur le néocortex

Cette délimitation anatomique est complétée par une délimitation fonctionnelle. L'observation clinique chez des patients ayant subi un trauma ou atteints de pathologies

cérébrales et l'expérimentation chez l'animal ont permis de définir des aires cérébrales qui se sont ensuite affinées par l'utilisation de techniques d'imagerie cérébrale contemporaine.

Une des premières aires fonctionnelles à être identifiée fut décrite au XIX^{ème} siècle par le médecin français Paul Broca chez un patient atteint d'aphasie. Ce patient présentait une lésion cérébrale au niveau du lobe frontal gauche lors de l'autopsie qu'il décrivit comme le siège du langage appelée alors l'aire de Broca. L'hypothèse d'une aire unique du langage fut réfutée par la découverte du neurologue Carl Wernicke, un peu plus tard au début du XX^{ème} siècle qui démontra la présence d'une autre aire cérébrale dans le lobe temporal gauche, l'aire de Wernicke, associée à la compréhension du langage. De plus grâce à l'expérimentation animale, des aires motrices ont été mises en évidence par des stimulations électriques dans la partie postérieure du lobe frontal provoquant une contraction musculaire (Fritsch and Hitzig, 2009). Au début du XX^{ème} siècle, Korbinian Brodmann a réalisé une avancée majeure par une classification en 52 aires cérébrales nommée la classification de Brodmann et qui est encore utilisée aujourd'hui (Figure 1c). Il a associé ces différentes aires à des fonctions spécifiques. On y retrouve notamment le cortex somesthésique primaire (aires 1, 2 et 3) recevant les stimuli sensoriels de la surface du corps ou encore le cortex visuel primaire (aire 17) important dans le traitement visuel. Il les a délimitées selon leurs différences dans la distribution spatiale des corps cellulaires (cytoarchitectonie) sur des coupes histologiques de cortex cérébral.

Au sein du cortex somesthésique primaire et moteur primaire, il existe, respectivement, une représentation topographique sensorielle et motrice. Wilder Penfield et ses collègues neurochirurgiens ont établi une première cartographie en reliant des stimulations électriques focalisées à la surface du néocortex avec des phénomènes sensoriels et moteurs affectant une partie particulière du corps et ils ont représenté cette somatotopie sous la forme de l'homoncule de Penfield (Penfield and Boldrey, 1937; Penfield and Rasmussen, 1950) (Figure 2). La surface corticale dédiée à une partie du corps est proportionnelle à la densité en récepteurs sensoriels et la finesse des mouvements nécessaire. On peut par exemple noter que l'étendue corticale relative dévolue aux mains et à la face est plus importante par rapport à leur surface relative sur le corps humain. Ces cartographies restent, de nos jours, exactes dans leur topographie générale malgré une structure fine qui se révèle plus compliquée (Barinaga, 1995).

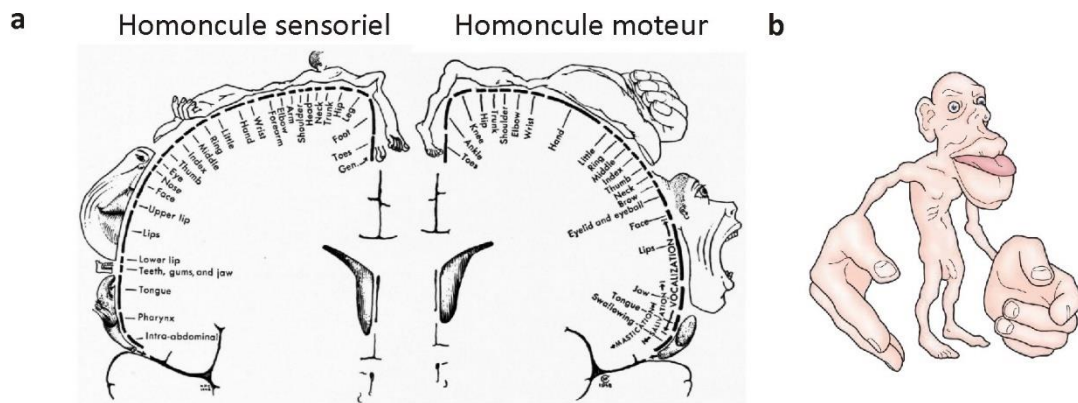


Figure 2 : L'homuncule sensoriel et moteur de Penfield. a) Penfield et collègues ont réalisé une représentation topographique sensorielle (gauche) et motrice (droite) basée sur la cartographie neurologique des aires et des proportions du corps humain dédiées aux fonctions sensorielles et motrices. b) Lorsque l'homuncule sensoriel est représenté en trois dimensions, on peut apprécier l'importance des lèvres, de la langue et des mains. *Adaptée de (a) Penfield and Rasmussen, 1950 et de (b) Neuroscience 6ème édition*

L'organisation laminaire du cortex cérébral

L'observation microscopique de coupes histologiques de néocortex et l'utilisation de techniques de coloration cellulaires ont conduit à des avancées majeures dans la compréhension de l'architecture cellulaire du cortex. Une de ses caractéristiques est son organisation laminaire tangentielle. On doit à Theodor Meynert les premières descriptions de cette organisation par une coloration de chlorure d'or et potassium (Figure 3a) (Meynert, 1888). On distingue dans le néocortex six couches superposées parallèle à la surface qui sont numérotées, de la plus superficielle à la plus profonde, de I à VI avec de possibles subdivisions indiquées par des lettres. Ces couches se différencient par leur densité cellulaire, la taille et la forme de ces cellules et par leurs connexions afférentes et efférentes avec d'autres régions cérébrales.

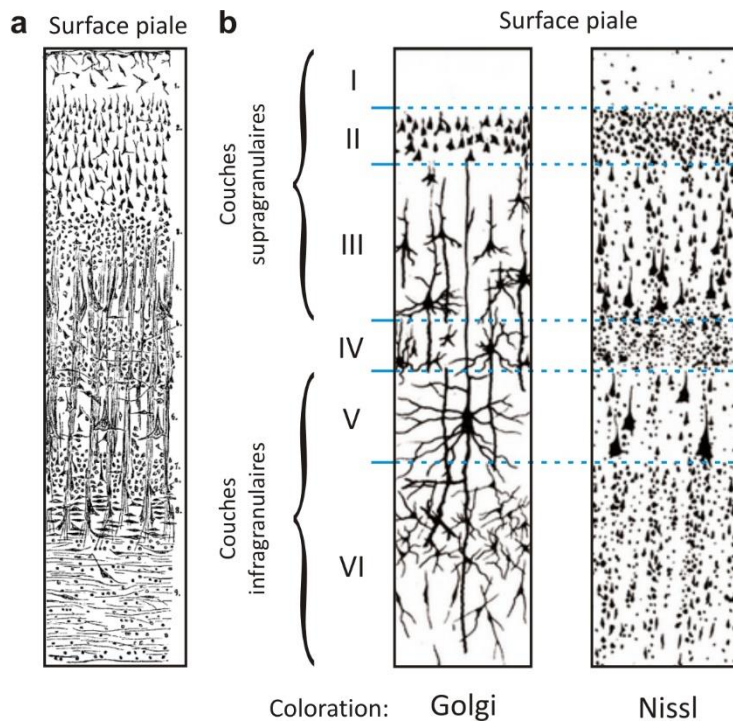


Figure 3 : Le néocortex est arrangé en couches successives.

a) Un dessin réalisé par Theodor Meynert grâce à l'observation microscopique de néocortex et qu'il divisa en 8 couches **b)** Sur ces dessins de colorations de Golgi et de Nissl, on remarque l'organisation en 6 couches du néocortex par les différences cellulaires. La coloration de Golgi marque des neurones et leurs neurites alors que la coloration de Nissl révèle leur corps cellulaire. *Adaptés de (a) Meynert, 1888 et de (b) dessins de Vogt C. & Vogt O.*

Dans le néocortex, ces différentes couches peuvent être regroupées en trois parties selon leur fonctionnalité et les couches sont séparées par leurs différences morphologiques (Figure 3b). En superficie, on retrouve les couches supragranulaires (couches I, II et III) qui envoient et reçoivent des connexions d'autres aires corticales. La couche I appelée couche moléculaire ou plexiforme est composée essentiellement de fibres nerveuses et de peu de cellules. Les couches II et III, difficilement distinguables l'une de l'autre, sont nommées couche granulaire externe et pyramidale externe, respectivement et sont constituées principalement de neurones pyramidaux, tirant leur nom de leur forme caractéristique.

On retrouve ensuite la couche granulaire interne ou couche IV qui reçoit la grande majorité des afférences thalamiques et est notamment composée de cellules étoilées et pyramidales. Elle forme la limite entre les couches supra- et infragranulaires.

Ensuite, les couches infragranulaires (couches V et VI) en profondeur projettent vers des régions sous-corticales. La couche V ou pyramidale interne présente une forte densité de neurones pyramidaux de grande taille. Ces neurones sont appelés cellules de Betz dans le cortex moteur primaire qui projettent, après une décussation, jusque sur les motoneurones de la moelle épinière. La couche VI ou polymorphe, la plus profonde, contient des cellules de forme irrégulière qui constituent une source importante des projections cortico-thalamiques.

Les aires corticales vont présenter des différences dans l'épaisseur de leurs couches. On peut noter, par exemple, que les aires sensorielles où sont reçues les informations par un relais thalamique présentent une couche IV plus développée que dans les aires motrices. De plus, certaines aires sensorielles comme le cortex somesthésique se distinguent par la particularité d'avoir une organisation verticale sous forme de colonnes en plus de cette organisation laminaire.

L'organisation columnaire du néocortex

Les neurones participant à l'intégration d'un même signal sensoriel sont regroupés radialement en colonnes formant ainsi des unités fonctionnelles. Mountcastle a montré, par l'insertion d'une électrode d'enregistrement traversant les différentes couches dans le cortex somesthésique, qu'un stimulus sur une zone précise de la peau provoque une réponse des neurones des différentes couches (II à VI) situé sur un même axe vertical (Mountcastle, 1957). L'hypothèse d'organisation en colonne est étayée par Hubel et Wiesel lorsqu'ils enregistrèrent de la même façon les neurones du cortex visuel chez le chat. Ils ont ainsi observé une activation optimale des neurones d'une même colonne, sélectivement, pour une orientation spécifique du stimulus lumineux présenté (Hubel and Wiesel, 1962).

Les colonnes forment des unités fonctionnelles de 300 à 500 μm de diamètre avec des interconnexions entre les couches et recevant des mêmes afférences extracorticales. On peut observer des particularités de l'organisation en colonne chez certaines espèces. Par exemple, les rongeurs présentent des regroupements denses de cellules en couche IV situés dans le cortex somesthésique des vibrisses ayant une forme caractéristique de « tonneaux » (Woolsey and Van der Loos, 1970) (Figure 4a et b). Dans chaque « tonneau », les neurones reçoivent les afférences provenant d'une seule vibrisse et répondent sélectivement à sa stimulation (Figure 4c). Cette somatotopie particulière fait du cortex en « tonneau » une aire très étudiée et documentée. En effet, elle a fait l'objet d'études sur le traitement de l'information sensorielle (Carvell and Simons, 1990; Andermann and Moore, 2006), la plasticité corticale (Fox, 1992) mais aussi sur le couplage neurovasculaire (Cox et al., 1993; Moskalenko et al., 1998) et neurométabolique (Voutsinos-Porche et al., 2003a). Ce modèle va particulièrement nous intéresser dans la suite de ce manuscrit.

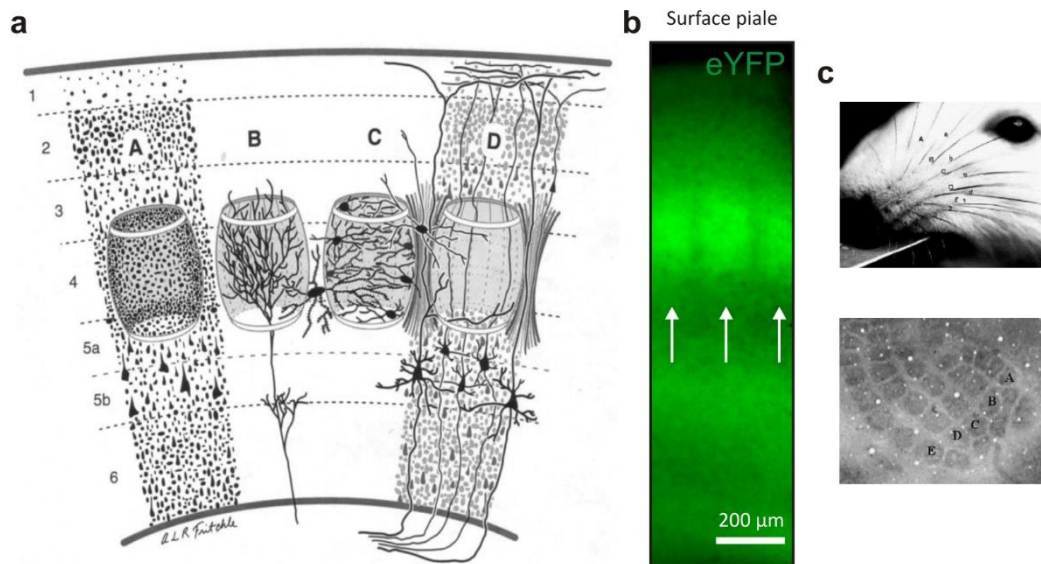


Figure 4 : Les « tonneaux », une particularité des colonnes du cortex somesthésique des vibrisses de rongeurs. a) Les « tonneaux » comprennent (A) une forte densité de cellules visibles par coloration de Nissl et (B) reçoivent en leur centre des afférences du noyau ventromédian du thalamus. (C) Ils présentent des quantités égales de cellules lisses et épineuses avec des dendrites surtout confinées à l'intérieur. Ces « tonneaux » sont séparés entre eux des septa, un espace avec peu de cellules. (D) Les dendrites des neurones infragranulaires et les axones des neurones supragranulaires passent surtout au niveau de ces septa. **b)** Les « tonneaux » (flèches blanches) du cortex somesthésique chez la souris permettent de bien visualiser l'organisation en colonne comme ici dans une section coronale de cortex dont les neurones expriment une protéine fluorescente. **c)** Chaque « tonneau » sur une coupe tangentielle après marquage va correspondre à une unique vibrisse. *Adapté de (a) Waite, 2004 et de (c) Hodge et al., 2002.*

Le cerveau humain reste encore une boîte noire sur certains points car il n'existe que peu de techniques d'étude non-invasives. Mais les études de cas cliniques, les analyses post-mortem, l'imagerie cérébrale fonctionnelle ainsi que l'expérimentation animale, respectueuse de l'éthique et tout en évitant l'anthropomorphisme, nous ont éclairés sur l'organisation et les fonctions du néocortex.

Rapprochons-nous encore un peu et détaillons les différents constituants du néocortex œuvrant en collaboration.

- Le néocortex est la structure superficielle des hémisphères cérébraux.
- Il est délimité en **lobes anatomiques** et en **aires corticales** selon leur fonction.
- Il est caractérisé par une **organisation laminaire tangentielle**, en six couches définies selon leur densité cellulaire, la morphologie des cellules qui la composent et leur connectivité, mais aussi en unités fonctionnelles sous forme de **colonnes radiales**.

L'unité neuro-glio-vasculaire

Les cellules du parenchyme cortical sont classées en deux grandes catégories : les neurones et les cellules gliales. Les neurones et les astrocytes, un type de cellules gliales, forment l'unité neuro-glio-vasculaire par leur relation étroite avec les cellules murales (i.e. cellules musculaires lisses et péricytes) et endothéliales des vaisseaux sanguins pour assurer, entre autres, le fonctionnement cérébral. Avant d'aborder l'étroite relation fonctionnelle de cette unité neuro-glio-vasculaire, nous allons nous intéresser individuellement aux cellules du néocortex qui se caractérisent par leur morphologie, leur activité physiologique et leur identité moléculaire et ensuite au réseau vasculaire cérébral.

Le neurone : une cellule spécialisée et diversifiée

Chez l'humain, le nombre de neurones dans le cerveau serait de plus de 80 milliards dont environ 20 % localisés dans le cortex cérébral (Azevedo et al., 2009). Les neurones sont des cellules électriquement excitables hautement spécialisées dans la transmission de l'influx nerveux. Une fois différenciés, ils n'entrent plus en mitose et ne sont généralement pas renouvelés bien qu'un débat subsiste sur l'existence de neurogenèse à l'âge adulte (Kempermann et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Les traits morphologiques, fonctionnels et moléculaires des neurones ont permis d'établir de multiples classifications pouvant varier selon les caractéristiques choisies (Ramón y Cajal, 1911; Markram et al., 2004; Ascoli et al., 2008a; DeFelipe et al., 2013).

Morphologiquement, les neurones présentent au niveau de leur soma deux types de prolongements cellulaires. Ils possèdent un axone qui est spécialisé dans la propagation de l'information nerveuse et des dendrites formant une arborisation qui est la cible principale des afférences des autres neurones pour établir des synapses. Cette synapse est la zone de communication entre l'axone d'un neurone (élément présynaptique) et un élément postsynaptique, par exemple l'épine dendritique ou le soma d'un autre neurone.

D'un point de vue fonctionnel, les neurones codent les informations nerveuses sous forme de potentiels d'action. L'électrophysiologie, basée sur l'étude de la cinétique ou de la forme des potentiels d'action comme la durée et l'amplitude mais également le motif de décharges de ces potentiels d'action, permet de distinguer différentes classes de neurones.

Au niveau moléculaire, les neurones sont capables de synthétiser et de libérer une grande variété de molécules. Certaines de ces molécules ont un effet sur les cellules ou tissus environnants comme les vaisseaux sanguins mais elles sont aussi très importantes dans la transmission synaptique. Cette transmission synaptique est principalement chimique (avec toutefois des synapses électriques homotypiques ou hétérotypiques ([Gibson et al., 1999](#); [Simon et al., 2005](#))) avec une libération par exocytose calcium-dépendante de vésicules de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, le mince espace entre les élément pré- et postsynaptiques. Le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sont les deux neurotransmetteurs majeurs et ont, respectivement, un effet excitateur et inhibiteur sur l'élément postsynaptique chez l'adulte. Le neurotransmetteur libéré par le neurone nous permet un premier niveau de classification selon deux grandes catégories : les neurones glutamatergiques et les neurones GABAergiques.

Les neurones glutamatergiques

Les neurones glutamatergiques sont présents dans toutes les couches corticales à l'exception de la couche I et ils représentent environ 80 % des neurones corticaux ([Baughman and Gilbert, 1981](#)). Ces derniers projettent au niveau intra- et extracortical faisant d'eux les neurones principaux du néocortex.

Neurotransmetteur

Le glutamate et l'aspartate sont des acides aminés et les principaux neurotransmetteurs excitateurs du cortex cérébral. ([Platt, 2007](#) pour une revue du rôle du glutamate dans le SNC). Le glutamate est synthétisé dans la terminaison présynaptique à partir de glutamine et d' α -cétoglutarate. Dans le néocortex, le glutamate est ensuite capté et stocké dans des vésicules synaptiques par les transporteurs vésiculaires spécifique du glutamate (VGLUT1 et VGLUT2 dans une moindre mesure dans le néocortex ([Reimer, 2013](#))). Une fois libéré, le glutamate peut agir sur les récepteurs ionotropes α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA), kainate et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et/ou métabotropes (mGluR). Le glutamate va ensuite diffuser en dehors de la fente synaptique et/ou être recapté essentiellement par les cellules gliales via les transporteurs GLAST et GLT1 ([Voutsinos-Porche et al., 2003b](#); [Herman and Jahr, 2007](#)).

Morphologie

Ces neurones glutamatergiques se divisent en deux catégories morphologiques : les neurones pyramidaux et les neurones étoilés épineux (Jones, 1975).

Les neurones pyramidaux

Les neurones pyramidaux tiennent leur nom de la forme conique de leur soma avec l'apex dirigé en général vers la surface piale (Figure 5a). Elles ont une dendrite apicale qui peut projeter jusqu'à la couche I où elle s'étend en un bouquet terminal. Des dendrites naissent aussi de la base du soma et se ramifient rapidement pour former une arborisation dendritique. Toutes les dendrites portent des épines qui reçoivent les contacts synaptiques excitateurs (Figure 5b) (Nimchinsky et al., 2002). Ces neurones possèdent un axone commençant de la base du corps cellulaire ou parfois d'une dendrite proximale et s'enfonce dans les couches cellulaires jusqu'à la substance blanche tout en se ramifiant.

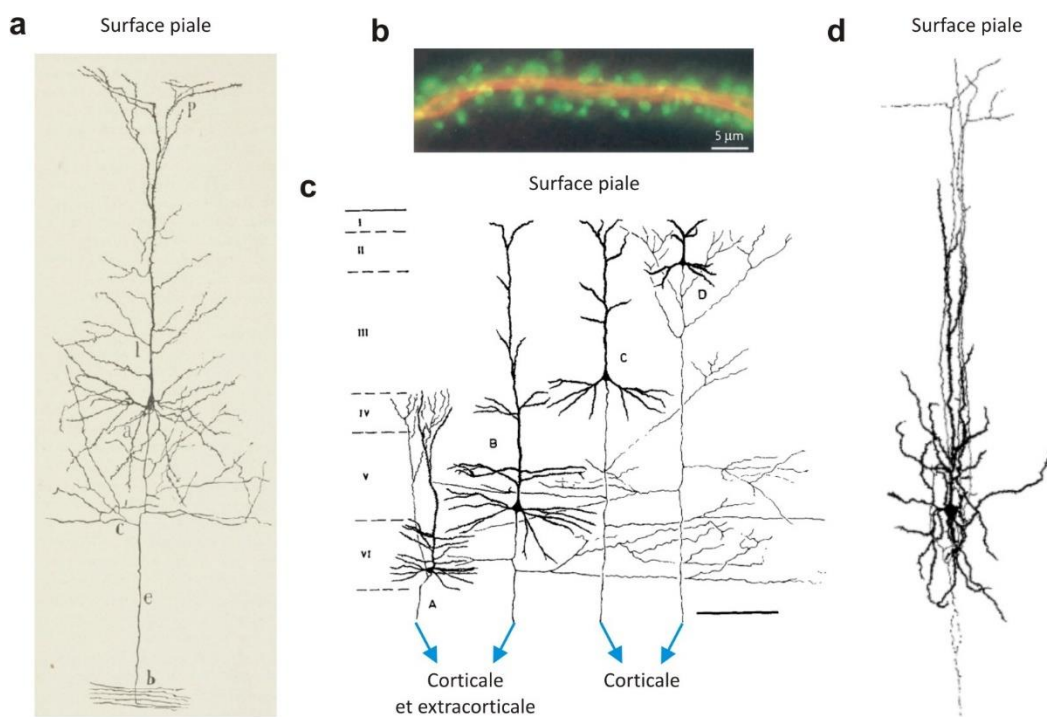


Figure 5 : Les neurones pyramidaux sont les principaux neurones glutamatergiques du néocortex. a) Le neurone pyramidal possède un soma conique caractéristique avec un arbre dendritique ascendant présentant (l) des ramifications qui s'étendent en (p) bouquet dans la couche I, (a) des dendrites basales se ramifiant horizontalement et (e) un axone descendant vers (b) la substance blanche pouvant (c) se ramifier. b) Les dendrites de ces neurones, visibles en marquant la protéine 2 associée aux microtubules (MAP2, en rouge) sont couverts d'épines dendritiques riches en actine (en vert) qui constituent des sites postsynaptiques. c) Selon leur couche corticale, ils présentent des tailles de soma et de prolongements différentes et ils ciblent des zones différentes. d) Certains neurones pyramidaux de la couche IV ont une forme multipolaire avec des dendrites naissant de l'ensemble du soma qui leur vaut le nom de « star-pyramid ». Adaptée de (a) Ramón y Cajal, 1911, (b) Spruston, 2008, (c) DeFelipe and Fariñas, 1992 et (d) Jones, 1975.

Ces neurones pyramidaux sont des cellules efférentes dont les cibles vont différer selon leur localisation et leur profondeur dans le cortex. Ces neurones adoptent des tailles de soma et de prolongements différents selon la couche ou l'aire étudiée. Les neurones pyramidaux des couches II et III sont plus petits que ceux des couches profondes V et VI ([van Aerde and Feldmeyer, 2015](#)). Les neurones pyramidaux supragranulaires vont avoir des projections cortico-corticales alors que les neurones infragranulaires projettent aussi en extra-cortical ([Figure 5c](#)) ([DeFelipe and Fariñas, 1992](#)). On peut rencontrer fréquemment en couche IV des neurones pyramidaux un peu atypiques avec un corps cellulaire de forme ovale et des dendrites irradiant du soma dans toutes les directions ([Figure 5d](#)). Ce rayonnement de dendrites fait qu'elles ont été nommées « star-pyramid » (pyramide étoilée) par Lorente de Nó présentant des similarités avec les neurones étoilés épineux ([De Nó, 1949](#)).

Les neurones étoilés épineux

Les neurones étoilés épineux partagent avec les neurones pyramidaux la particularité d'avoir des dendrites avec des épines ainsi qu'un axone naissant et projetant vers la substance blanche. Ce sont des cellules multipolaires avec des dendrites émergeant de l'ensemble du soma mais sans dendrite apicale projetant jusqu'à la couche I. On les retrouve dans les cortex sensoriels comme le cortex somesthésique en couche IV ([Jones, 1975](#)) où leurs dendrites vont se confiner à un « tonneau » ([Woolsey and Van der Loos, 1970](#); [Petersen, 2007](#)).

Electrophysiologie

Electrophysiologiquement, les neurones glutamatergiques se distinguent selon deux types de décharges de PA : une décharge habituelle ou « regular-spiking » (RS), la plus courante, ou une décharge en bouffée ou « intrinsically bursting » (IB) (pour revue [McCormick et al., 1985](#)).

Les neurones RS ont été nommés par Mountcastle et ses collègues ([Mountcastle et al., 1969](#)). Lors de leurs enregistrements *in vivo*, ce sont les neurones qu'ils rencontraient le plus régulièrement. Ces neurones présentent des potentiels d'action de longue durée (de l'ordre de la milliseconde à mi-hauteur) et une diminution de leur fréquence de décharge, ou adaptation, lors d'une dépolarisation prolongée. Quand ils sont stimulés au seuil minimal de décharge (rhéobase), ils génèrent des potentiels d'action uniques. Après la repolarisation, ils ont une phase d'hyperpolarisation (« afterhyperpolarisation » ou AHP) relativement lente ([Figure 6a](#)).

A l'inverse, les neurones IB vont décharger à la rhéobase une bouffée de potentiels d'action à haute fréquence ou un « burst » due aux propriétés intrinsèques de leur membrane (Figure 6b) (Connors and Gutnick, 1990). Ils sont plus rares que les neurones RS et plutôt localisés dans les couches IV et V du néocortex (Figure 6c).

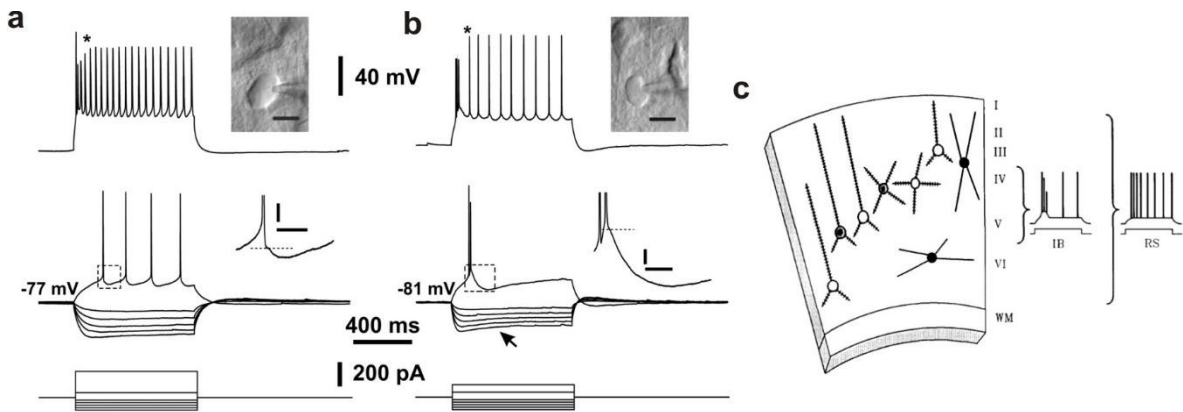


Figure 6 : Les profils de décharges des neurones glutamatergiques et leur localisation. On peut distinguer deux motifs de décharge. **a)** Un profil de décharge régulier (RS) avec des potentiels d'action de longue durée et une faible adaptation de fréquence juste au-dessus du seuil de décharge (trace centrale) et qui présente, à haute intensité de stimulation, une adaptation de fréquence plus marquée (trace supérieure). **b)** Il y a aussi certains neurones avec une décharge en bouffée (IB), visible juste au-dessus du seuil de décharge (trace centrale) et qui à plus haute intensité présente une bouffée de potentiels d'action initiale suivi par des potentiels d'action uniques (trace supérieure). Notez le fléchissement prononcé après le pic initial lors de l'injection d'un courant hyperpolarisant (flèche noire). Ces deux classes électrophysiologiques présentent une accommodation d'amplitude à haute intensité (notée par l'astérisque sur les traces supérieures (a) et (b)). **c)** On retrouve les neurones RS des couches II à VI alors que les neurones IB sont plus localisés dans les couches IV/V. Adaptée de (a, b) Karagiannis et al., 2009 et (c) Connors and Gutnick, 1990.

Les neurones glutamatergiques sont les neurones excitateurs spécialisés dans la propagation des signaux nerveux et l'activation locale mais aussi distale d'autres neurones.

Ce sont particulièrement les neurones pyramidaux des couches supragranulaires qui vont nous intéresser dans la suite de ce manuscrit. Il semble néanmoins important d'explorer les autres cellules corticales avec qui ils interagissent morphologiquement et fonctionnellement et particulièrement les neurones GABAergiques avec qui ils forment une balance d'excitation/inhibition.

Les neurones GABAergiques

Environ 15 à 30 % des neurones utilisent le GABA comme neurotransmetteur (Houser et al., 1983) et sont présents dans toutes les couches du néocortex. Ces neurones sont nommés aussi interneurones GABAergiques pour leur relation avec les autres neurones localement. On rencontre toutefois des neurones GABAergiques de projection cortico-corticale (Tomioka and Rockland, 2007; Rock et al., 2018).

Neurotransmetteur

Une majorité de synapses inhibitrices utilise le GABA comme neurotransmetteur. Il est synthétisé dans la terminaison présynaptique à partir du glutamate par les décarboxylases de l'acide glutamique (GAD) qui sont presque exclusivement dans les neurones GABAergiques. A l'instar du glutamate, le GABA est ensuite capté dans des vésicules dans la terminaison présynaptique par des transporteurs vésiculaires pour être libéré par exocytose dans la fente synaptique. Il va agir sur des récepteurs ionotropes GABA_A et/ou des récepteurs métabotropes GABA_B. Il va ensuite diffuser et être recapté par des transporteurs spécifiques par les neurones et les cellules gliales pour être recyclé ou dégradé.

Mais bien qu'ils soient tous GABAergiques, la grande hétérogénéité de ces interneurones et le recoupement entre les classifications morphologique, électrophysiologique et moléculaire rend complexe de s'arrêter à une unique classification. Je vais donc succinctement présenter la morphologie et l'électrophysiologie des interneurones GABAergiques et m'appuyer sur la classification par une approche multiparamétrique réalisée au laboratoire.

Morphologie

En pionnier, Ramon y Cajal visualisa, par une coloration de Golgi, des neurones à axone court qu'il nomma « neurone avec un cylindre-axe court » en comparaison aux neurones pyramidaux (Ramón y Cajal, 1911). Par la suite, Lorente de Nó a décrit une hétérogénéité de ces neurones et commença la classification morphologique (Fairént et al., 1992 pour traduction). Leur axone peut cibler préférentiellement un sous-domaine neuronale postsynaptique (soma, dendrites ou axone). Suivant le compartiment ciblé, on parle de neurone axo-somatique (*e.g.* cellule en panier), axo-dendritique (*e.g.* cellules de Martinotti) ou axo-axonique (*e.g.* cellules en chandelier). Leur arborisation dendritique est très diversifiée et est généralement dépourvue d'épines d'où le nom de neurones peu ou non-épineux (« sparsely spiny » ou « aspiny neurons »). Ainsi, on peut classer les interneurones

GABAergiques selon la forme de leur soma, la ramification et la cible de leur axone et enfin la polarité et la ramification de l'arborisation dendritique (*e.g.* cellules bipolaires (Peters and Harriman, 1988)) (pour revue Ascoli et al., 2008b; DeFelipe et al., 2013; Markram et al., 2004).

Electrophysiologie

Les interneurons GABAergiques présentent aussi une diversité électrophysiologique plus grande que les neurones glutamatergiques. Sans entrer dans les détails, on peut rencontrer des neurones présentant une adaptation (« adapting ») de fréquence comme les neurones RS mais aussi des profils de décharge à haute fréquence de décharge (« fast-spiking » ou FS), ou en bouffée de potentiels d'action (« bursting »).

Ces classification morphologique et électrophysiologique, utilisées isolément, donnent un premier aperçu de la diversité des interneurons GABAergiques. Les approches multiparamétriques prenant en compte leur morphologie et leur électrophysiologie mais aussi leur identité moléculaire (Kawaguchi, 1993, 1995; Cauli et al., 1997, 2000, 2014; Kawaguchi and Kubota, 1997; Porter et al., 1998; Karagiannis et al., 2009) sont nécessaires pour mieux comprendre le possible rôle fonctionnel de ces interneurons. La technique de patch-clamp sur cellule unique (Lambolez et al., 1992; Devienne et al., 2018) combinant le patch-clamp, la RT-PCR et un marquage morphologique des neurones enregistrés (Figure 7a), utilisée couramment au laboratoire, permet une classification de ces interneurons (Karagiannis et al., 2009).

Certaines classes d'interneurons participent au couplage neurovasculaire par la synthèse de messagers vasoactifs (Cauli et al., 2004, 2014; Cauli and Hamel, 2010, 2018) comme :

- Les interneurons exprimant le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) avec un profil de décharge adaptative (Figure 7b) ou en bouffée (Figure 7c). Ils sont principalement bipolaire ou double bouquet avec les dendrites dirigées perpendiculairement à la surface avec un axone descendant (Peters and Harriman, 1988; Porter et al., 1998).
- Les interneurons exprimant la parvalbumine (PV), une protéine de fixation du calcium, généralement capables de décharger des potentiels d'action à haute fréquence ce qui leur vaut le nom de « FS-PV » (Figure 7d) (Kawaguchi and Kubota, 1993; Cauli et al., 1997). Ils ont essentiellement une arborisation dendritique multipolaire et exercent une inhibition périsonotique sur les neurones pyramidaux

(Reyes et al., 1998; Tamás et al., 2004; Freund and Katona, 2007). Certains de ces interneurons peuvent synthétiser le neuropeptide Y (NPY) (Karagiannis et al., 2009), un puissant vasoconstricteur ou encore l'activateur tissulaire du plasminogène (Tasic et al., 2016).

- Les interneurons à somatostatine (SOM) à décharge adaptative (Figure 7e), parfois en bouffée (Kawaguchi and Kubota, 1996) avec une morphologie bipolaire, en double bouquet ou multipolaire et un axone ascendant qui développe une arborisation en couche I (Kawaguchi and Kubota, 1996). En plus de la SOM, certains de ces interneurons ont la capacité de synthétiser des messagers vasoactifs comme le NPY et le monoxyde d'azote (NO) (Karagiannis et al., 2009), un gaz vasodilatateur.
- Les interneurons neurogliaformes à NPY avec un motif de décharge adaptative généralement retardée à la rhéobase (Figure 7f) généralement multipolaires. Ce sont les principaux neurones retrouvés en couche I mais également dans les autres couches (Tamas, 2003; Simon et al., 2005; Oláh et al., 2007; Molnár et al., 2014). A l'instar des interneurons à SOM, une grande partie de ces neurones vont produire du NO (Karagiannis et al., 2009).

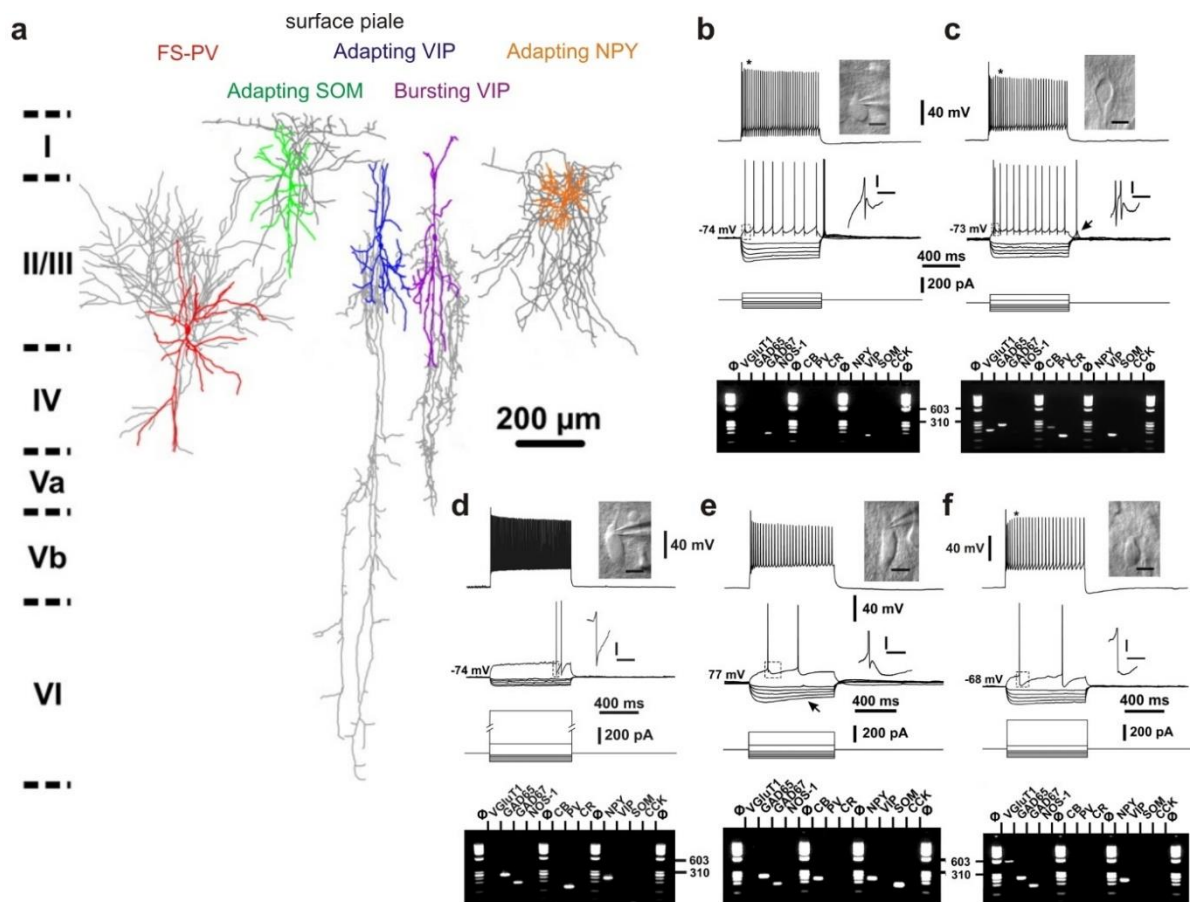


Figure 7 : Les interneurons GABAergiques sont caractérisés par une grande hétérogénéité. L'utilisation de la RT-PCR sur cellule unique après patch-clamp permet d'avoir accès à la morphologie (a), à leur nature électrophysiologique grâce au patch-clamp (b-e, trace supérieure et centrale) et moléculaire par réalisation de la RT-PCR en ciblant les gènes d'intérêt du cytoplasme et migrant sur gel d'agarose (b-e, photographie du gel en bas). On a un aperçu, ici, de cette diversité avec les interneurons VIP (a, bleu et violet) qui ont (b) une décharge adaptative ou (c) en bouffée, (d) les interneurons FS-PV, (e) les interneurons à SOM (a, vert) avec une décharge adaptative ou encore (f) les interneurons à NPY (a, orange) avec aussi une décharge adaptative. Adaptée de Karagiannis et al., 2009.

Les interneurons GABAergiques sont essentiels dans la régulation de la décharge des neurones glutamatergiques (Xu et al., 2013), dans la synchronisation et génération de rythmes corticaux dans la bande gamma pour les interneurons à PV (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009) ou delta pour les interneurons à SOM et à NO (Zielinski et al., 2019), dans la sélectivité des informations sensorielles (Pinto et al., 2003) mais aussi dans la plasticité cérébrale (Jones, 1993).

Ces neurones sont entourés de cellules gliales, déterminantes dans l'homéostasie cérébrale.

Les cellules gliales

Le terme de « glie » émerge dans un commentaire d'une publication de Rudolph Virchow en 1846 et qu'il popularisera par la suite (Kettenmann and Verkhratsky, 2008). On retrouve aussi ces cellules gliales dans la littérature sous le nom de névroglie. Ces cellules sont appelées « glie » car elles étaient reléguées à tort à un simple rôle de « ciment/mastic ». Pourtant, les cellules gliales sont essentielles en participant à la neurotransmission, l'homéostasie cérébrale, l'immunité, la conduction de l'information nerveuse et bien d'autres rôles primordiaux pour le développement et le bon fonctionnement du cerveau (Allen and Lyons, 2018). Le nombre de cellules gliales est du même ordre que celui des neurones dans le cerveau (von Bartheld et al., 2016). On distingue deux classes de glies selon leur taille dans le SNC : les cellules macrogliales comprenant les astrocytes et les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

Les astrocytes

Les astrocytes représentent 20 % des cellules dans le cerveau (von Bartheld et al., 2016). Ces astrocytes tiennent leur nom de leur forme caractéristique avec des prolongements cytoplasmiques locaux généralement en étoile (du grec ancien *astro* : étoile et *cyte* : cellule) (Verkhratsky and Nedergaard, 2018 pour revue).

Morphologie

Généralement, les astrocytes possèdent un petit soma ($\approx 10 \mu\text{m}$) avec des prolongements cytoplasmiques qui se ramifient pour former une arborisation périphérique dense et buissonneuse (Figure 8a, b). Les astrocytes forment des microdomaines territoriaux par leur arborisation qui ne se recouvrent pas entre eux (Bushong et al., 2002) mais aussi des syncytia fonctionnels en étant connectés les uns aux autres via des jonctions communicantes qui peut représenter un « tonneau » entier dans la couche IV du cortex somesthésique. (Houades et al., 2006). Cette connectivité permet une signalisation intracellulaire et extracellulaire par le biais d'une diffusion de molécules entre les astrocytes. La couverture de lame basale vasculaire externe, couche de matrice extracellulaire, par un feuillet astrocytaire est quasi-continue (Chédotal et al., 1994; Abounader and Hamel, 1997; Mathiisen et al., 2010; McCaslin et al., 2011). Les astrocytes corticaux se distinguent en deux grandes classes moléculaires (Zeisel et al., 2015) constituant la *glia limitans perivascularis* ou la *glia limitans superficialis*, au niveau de la pie-mère. De plus, ils contactent les neurones et les vaisseaux sanguins

intracorticaux par les pieds astrocytaires ou directement au niveau de leur soma (McCaslin et al., 2011) (Figure 8c). La transcription locale dans ces prolongements permettrait aux astrocytes d'être fonctionnellement compartimentés pour réguler d'un côté, la transmission synaptique et de l'autre, les fonctions vasculaires et métaboliques (Mazaré et al., 2021).

Rôle physiopathologique

Ainsi, les astrocytes régulent l'homéostasie générale du cerveau d'un point de vue ionique, métabolique et des neurotransmetteurs en englobant, par leurs pieds astrocytaires, les terminaisons pré- et postsynaptique. Ils forment une synapse tripartite (Araque et al., 1999) en participant à l'activité synaptique par la recapture, le catabolisme et la transmission synaptique (Araque et al., 1998; Bezzi et al., 1998). Les astrocytes modulent cette dernière par la libération de neurotransmetteurs de l'élément présynaptique par la production et/ou la libération de gliotransmetteurs comme la D-serine (Panatier et al., 2006; Yang et al., 2010), l'acide kynurénique (Pocivavsek et al., 2011), le glutamate (Li et al., 2012) ou encore le lactate (Magistretti and Allaman, 2018).

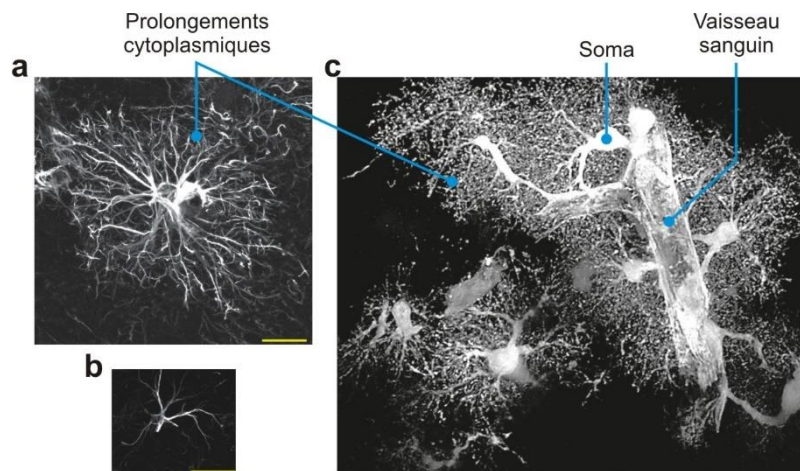


Figure 8 : Les astrocytes sont des cellules gliales ramifiées. a,b) La ramification des prolongements cytoplasmiques astrocytaires sont visibles par un marquage de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). A la même échelle, on voit que (a) les astrocytes humains sont plus étendus que (b) chez la souris (barre d'échelle : 20 µm). c) Chaque astrocyte (visible ici par l'expression de la EGFP) a au moins un prolongement qui va contacter un vaisseau sanguin et le recouvrir intégralement. Adaptée de Verkhratsky and Nedergaard, 2018.

Les astrocytes ont un positionnement idéal pour la capture de glucose et d'autres métabolites et assurent un trophisme neuronal par leur organisation subcellulaire entre les neurones et les vaisseaux sanguins. Ils régulent cet apport d'énergétique par un contrôle de la perfusion sanguine. De plus, l'apposition des astrocytes autour des vaisseaux sanguins crée la paroi

externe d'un espace périvasculaire où circule du liquide céphalorachidien (Iff et al., 2012). Cette particularité anatomique, plus prononcée dans la couche moléculaire (Zhang et al., 1990) prendrait part au système glymphatique, un système de clairance des sous-produits de l'activité neuronale analogue au système lymphatique.

Les astrocytes participent à la réponse aux lésions du SNC par une astrogliose réactive (Wilhelmsson et al., 2006) provoquant des changements de leur morphologie et de leur expression moléculaire (Sofroniew, 2009). Ainsi, ils permettent l'infiltration des leucocytes dans le SNC, la réparation de la barrière hématoencéphalique, la protection des neurones et la cicatrisation gliale (Bush et al., 1999).

Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes ont été décrits grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique d'imprégnation par Del Río Hortega comme des cellules gliales avec peu de prolongements cytoplasmiques (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Pérez-Cerdá et al., 2015). Ce sont des cellules myélinisantes qui déploient et enroulent leurs prolongements sur les axones des neurones adjacents pour former des gaines de myéline séparées périodiquement par des nœuds de Ranvier où l'axone est exposé au milieu extracellulaire (Figure 9). Ils ont un rôle primordial dans la conduction de l'influx nerveux en provoquant une conduction saltatoire où l'impulsion saute de nœuds en nœuds. Cette conduction saltatoire est plus rapide par rapport à la conduction d'un axone nu. Ces gaines de myéline aident aussi au développement et à la maintenance des axones.

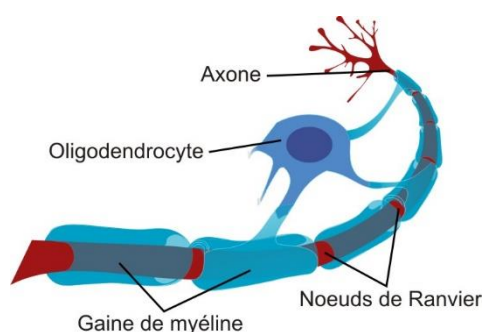


Figure 9 : L'oligodendrocyte est une cellule gliale myélinisante. Ces prolongements vont s'enrouler autour d'un axone pour former une gaine de myéline. Ces gaines de myéline sont espacées par des nœuds de Ranvier où l'axone est en contact direct avec le milieu extracellulaire favorisant la conduction saltatoire.

La microglie

On doit aussi la première description de la microglie à Del Río Hortega par sa technique d'imprégnation. Ces cellules possèdent un petit corps cellulaire entouré par une dense

ramification de prolongements. Ce sont des cellules spécialisées de l'immunité innée et elles agissent comme des macrophages résidents du parenchyme. En condition physiologique, ces cellules scannent et surveillent en permanence leur environnement et, à la détection d'un signal lésionnel, elles vont adopter une forme amiboïde, plus ronde et compacte avec un plus gros corps cellulaire et des prolongements plus courts et épais (Figure 10). Dans cette morphologie, la microglie peut se diriger vers la cible et débiter un processus de phagocytose.

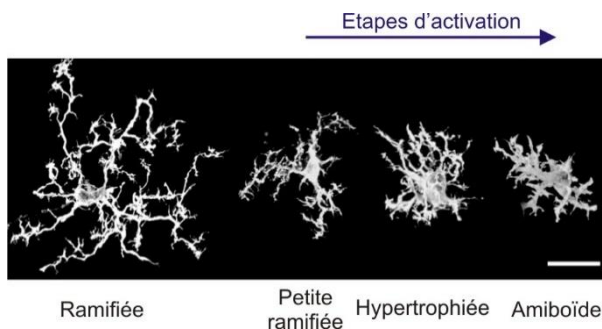


Figure 10 : Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes du SNC. En condition physiologique, la microglie adopte une morphologie ramifiée et lors de stimuli lésionnels, elles vont s'activer en adoptant une forme amiboïde et acquérir une capacité phagocytaire. *Adaptée de Yamada and Jinno, 2013.*

De plus, la microglie participe à la modulation de la neurotransmission et à la plasticité synaptique formant avec les neurones et les astrocytes la synapse quadripartite (Schafer et al., 2013). Elle participe aussi à l'homéostasie synaptique par l'élimination d'épines dendritiques durant le développement et le stade post-natal (Paolicelli et al., 2011).

L'ensemble de ces cellules sont dépendantes d'un apport énergétique conséquent et constant. Un réseau vasculaire dense va assurer ce transport et cette distribution indispensable d'énergie. Un arrêt de la perfusion sanguine de quelques minutes peut causer une mort neuronale et des dommages cérébraux irréversibles.

Le réseau vasculaire

Le réseau vasculaire cérébral représente environ trente à cinquante centimètres de vaisseaux sanguins par millimètre cube de tissu cortical chez l'Homme et près d'un mètre par millimètre cube de tissu cortical chez la souris (Tsai et al., 2009; Ji et al., 2021). Ce réseau dense est constitué de vaisseaux sanguins dont la structure et l'innervation varient le long de l'arbre vasculaire cérébral pour assurer une distribution efficace de l'oxygène et du glucose. Ce transport d'énergie se fait par le sang circulant, pompé par le cœur, à travers le réseau vasculaire.

Le sang, vecteur d'énergie

Le sang est composé de cellules, les éléments figurés du sang, comme les hématies (appelées aussi érythrocytes ou globules rouges), les leucocytes (ou globules blancs) et les thrombocytes (ou plaquettes). L'ensemble de ces cellules baignent dans le plasma, constitué d'eau, de protéines mais aussi de ressources énergétiques indispensables pour le néocortex comme le glucose et le dioxygène. Toutefois, c'est l'hémoglobine des hématies qui fixe en grande partie le dioxygène grâce aux cations ferriques de leurs hèmes, au niveau des veines pulmonaires, et le libère dans le reste de l'organisme. À l'inverse, les hématies vont capter le dioxyde de carbone au niveau des tissus et le libérer au niveau des artères pulmonaires. Les échanges gazeux au sein du néocortex sont rendus possibles par les différences de pression favorisant une diffusion passive entre le sang et le tissu cérébral (Ndubuizu and LaManna, 2007; Devor et al., 2011; Lyons et al., 2016).

Le cerveau reçoit environ 15 % du débit cardiaque alors qu'il ne représente que 2 % du poids du corps (Williams and Leggett, 1989; Xing et al., 2017). Cette perfusion est assurée par deux ensembles de ramifications naissant de l'aorte dorsale.

La perfusion cérébrale

La perfusion du cerveau est assurée par des artères de gros calibre, les artères carotides internes, des collatérales des artères carotides communes, pour la partie antérieure et par les artères vertébrales pour la partie postérieure (Figure 11a). Du côté gauche du corps, l'artère carotide commune naît directement de la partie dorsale de la crosse aortique et l'artère vertébrale naît de l'artère sous-clavière, tandis qu'à droite du corps, les deux naissent du tronc artériel brachio-céphalique. Les artères carotides internes vont ensuite se ramifier en artères cérébrales moyennes (sylviennes) et antérieures. Les artères vertébrales vont, elles, se réunir pour former l'artère basilaire sur la face médiane du tronc cérébral au niveau du pont puis donner les artères cérébrales postérieures en ramifications terminales (Figure 11b).

Ces deux principales sources d'irrigation, originaires des artères carotides internes et de l'artère basilaire, vont s'anastomoser grâce aux artères communicantes antérieures et postérieures pour former le polygone de Willis. Cet anneau artériel est un système de sécurité redondant qui maintient la perfusion sanguine cérébrale constante même en cas d'occlusion unilatérale d'une des artères principales.

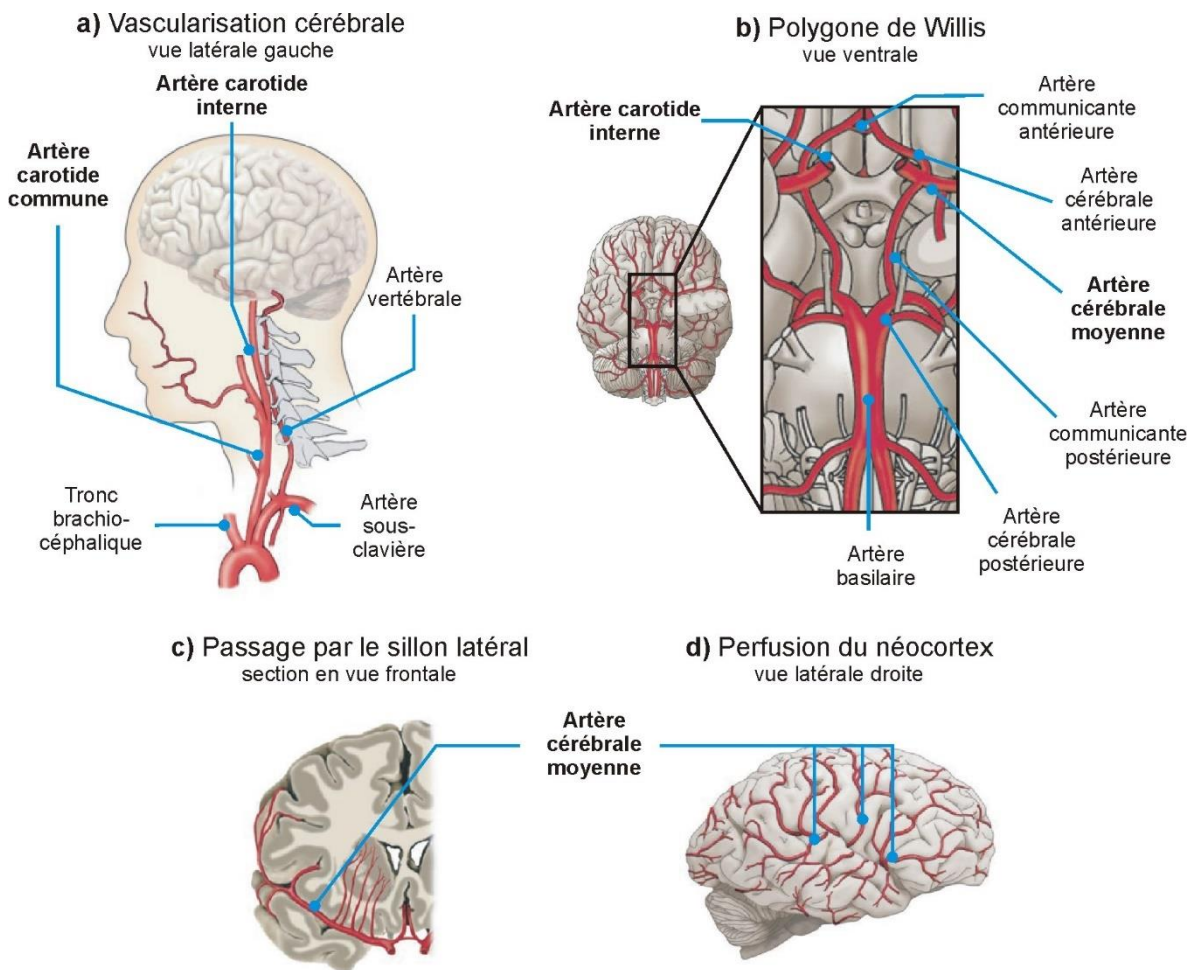


Figure 11 : Du cœur au cortex somesthésique primaire. a) La partie antérieure du cerveau est perfusée par les artères carotides internes b) qui vont s'anastomoser avec les artères vertébrales et constituer le cercle de Willis au niveau du pont. c) L'artère cérébrale moyenne va naître de ce cercle de Willis pour cheminer dans le sillon latéral puis sur la surface du néocortex pour irriguer les lobes frontal, temporal et pariétal dont le cortex somesthésique primaire. *Adaptée de Neuroscience 6ème édition.*

L'artère cérébrale moyenne garantit l'irrigation de la face latérale des lobes frontal, temporal et pariétal et chemine dans le sillon latéral (Figure 11c et d). Elle va finalement se ramifier en artères piales constituant un réseau artériel complexe parcourant la surface du néocortex.

La vascularisation du néocortex

Les artères piales parcourent la surface du néocortex au niveau de l'espace sous-arachnoïdien, où circule le liquide céphalorachidien. Elles ont une *media* épaisse de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (Roggendorf and Cervós-Navarro, 1977) et d'une couche externe de cellules leptoméningées.

Les ramifications des artères piales vont ensuite s'enfoncer radialement dans le parenchyme (Duvernoy et al., 1981) pour devenir des artéioles pénétrantes (Figure 12) tout en conservant ce feuillet cellulaire méningé mais avec seulement une couche de cellules musculaires lisses. En s'enfonçant dans le néocortex, ce feuillet va former un espace périvasculaire nommé l'espace de Virchow-Robin (Jones, 1970; Zhang et al., 1990). Il repose sur les artéioles pénétrantes et les *glia limitans* et permet la circulation du liquide céphalorachidien provenant de l'espace sous-arachnoïdien.

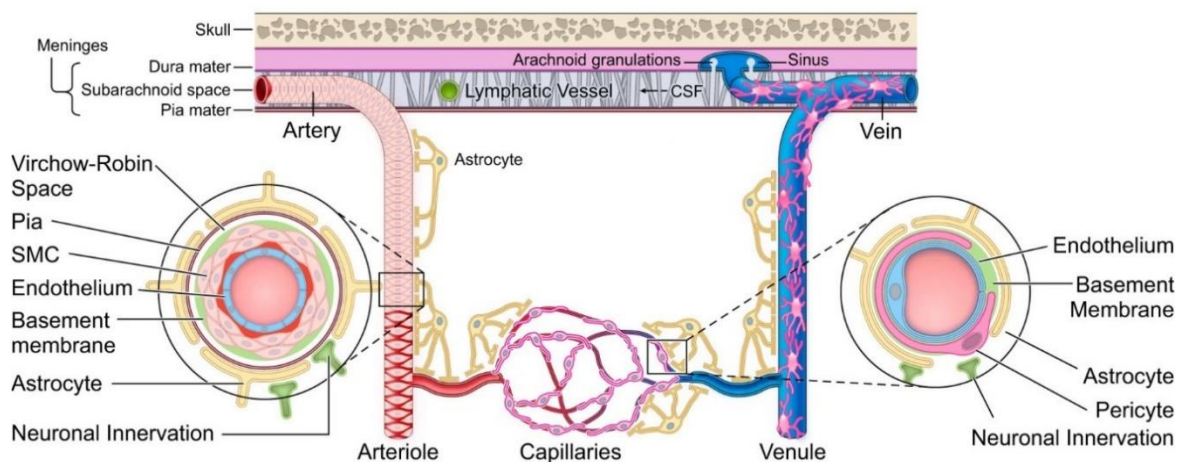


Figure 12 : La vasculature néocorticale. Les artères piales vont cheminer dans l'espace sous-arachnoïdien et se ramifier en artéioles pénétrantes s'enfonçant dans le parenchyme cortical. A mesure qu'elles vont s'enfoncer, leur tunique musculaire va diminuer et elles vont se ramifier en artéioles précapillaires. Les capillaires vont constituer la zone d'échange métabolique principale entre le sang et le parenchyme. Le réseau capillaire est connecté, par les veinules postcapillaires, aux veinules ascendantes. Les veinules vont remonter vers la surface piale et former les veines piales se déversant dans les sinus veineux durs. *Adaptée de Sweeney et al., 2019.*

En continuant de s'enfoncer dans le parenchyme, les artéioles pénétrantes se ramifient en artéioles précapillaires. Le nombre de cellules musculaires lisses les entourant va diminuer jusqu'à laisser place à des péricytes au niveau des artéioles précapillaires. De plus, en pénétrant davantage dans le parenchyme, l'espace de Virchow-Robin va disparaître et la membrane basale se retrouve en contact direct avec les pieds astrocytaires avoisinants (Girouard and Iadecola, 2006).

Les artéioles vont hautement se ramifier en un riche réseau de capillaires, d'environ 1000 capillaires par millimètre cube de tissu cortical, qui forment des boucles interconnectées

(Traystman, 2017). Ce réseau ne se développe pas aléatoirement mais cible particulièrement les couches cellulaires métaboliquement très actives comme la couche IV (Ji et al., 2021). Ces capillaires sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales entourée par leur membrane basale qui par intervalle laisse place à des péricytes. L'ensemble est recouvert par des pieds astrocytaires sur la paroi abluminale. Bien qu'une partie de l'oxygène sanguin est délivrée au niveau artériolaire (Sakadžić et al., 2014), le réseau capillaire assure la majorité des échanges en oxygène et en substrats métaboliques.

Le sang pauvre en oxygène rejoint ensuite la circulation veineuse par les veinules postcapillaires. Ces veinules postcapillaires se connectent aux veinules ascendantes s'élargissant en remontant à la surface du parenchyme pour communiquer avec les veines piales. Ces veinules et veines ont une couverture incomplète en cellules musculaires lisses par rapport au réseau artériel (Figure 13) (Hill et al., 2015). Le sang veineux du néocortex est par la suite drainé dans les sinus veineux duraux et se déverse dans la circulation générale par les veines jugulaires internes (Egemen and Solaroglu, 2017).

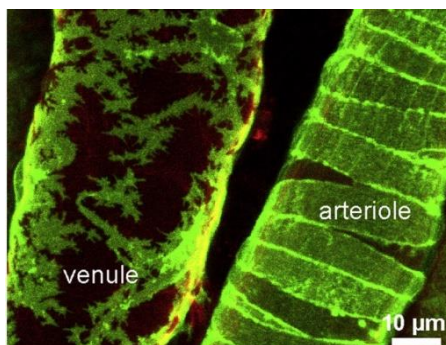


Figure 13 : Des cellules musculaires lisses entourent l'endothélium vasculaire. Les cellules musculaires lisses sont plus denses et enveloppent complètement les artérioles alors que sur les veinules, elles sont disposées en mosaïque, plus espacées les unes des autres et moins nombreuses. Ici, les cellules musculaires lisses sont visibles par leur expression de la mGFP verte et toutes les membranes par celle de la mTomato rouge. *Adaptée de Hill et al., 2015.*

La densité vasculaire est hétérogène mais covarie, chez la souris, avec la densité neuronale (Tsai et al., 2009). Par exemple, dans le cortex somesthésique de vibrisse de rongeur, chaque « tonneau » va être irrigué en moyenne par une artériole pénétrante et drainé par deux à trois veinules ascendantes (Woolsey et al., 1996; Blinder et al., 2013), avec une forte densité de capillaires plus importante au sein du « tonneau » qu'au niveau des *septa* (Patel, 1983). La perfusion sanguine d'une zone corticale à une autre peut donc varier selon la densité vasculaire mais également dans le temps selon le flux sanguin qu'elle va recevoir.

La structure des vaisseaux corticaux

Les vaisseaux sanguins cérébraux vont ériger une vasculature composée d'artérioles, de veinules et de capillaires se distinguant par leur structure et leur fonction.

Les artérioles et les veinules vont être constituées de trois couches appelées tuniques différentes histologiquement (Baker, 1937; Lee, 1995) (Figure 14):

- L'*intima* est la couche la plus interne des vaisseaux en contact direct avec le sang et forme la lumière des vaisseaux. Elle est composée d'un endothélium entouré d'une lame basale élastique interne fenestrée. Les cellules endothéliales sont jointes les unes aux autres par des jonctions serrées pour former la barrière hématoencéphalique.
- La *media*, la couche moyenne des vaisseaux composée de collagène et un peu de fibres d'élastine qui contient les cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes).
- L'*adventice*, qui va former la couche externe et constituée essentiellement de fibres de collagène et de fibroblastes.

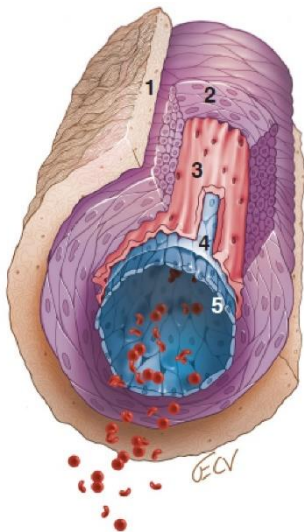


Figure 14 : Représentation schématique de la paroi d'une artériole cérébrale. Les artérioles sont composées, de la couche la plus externe à la plus interne, de :

- (1) L'*adventice* surtout constituée de collagène,
- La *media* constituée (2) de cellules musculaires lisses et (3) de fibres élastiques,
- L'*intima* constituée (4) d'une lame basale et (5) de cellules endothéliales formant l'endothélium vasculaire.

De Shen et al., 2012.

L'endothélium

Les cellules endothéliales sont jointes les unes aux autres par des jonctions serrées pour former la barrière hématoencéphalique. Cette propriété propre au SNC est essentielle au maintien de son intégrité à l'encontre des toxines et des pathogènes ainsi qu'au contrôle du passage des ions et des molécules vers le parenchyme grâce à de nombreux transporteurs spécifiques pour les ions, les peptides et les substrats énergétiques et grâce à de la transcytose

régulée par l'intermédiaire de cavéoles (Zlokovic, 2008). L'endothélium participe aussi à la coagulation, l'inflammation, l'angiogenèse et dans le maintien d'une perfusion sanguine adéquate par la synthèse de messenger vasoactifs.

Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses sont orientées perpendiculairement à l'axe des artérioles et les entourent ce qui permet de contrôler efficacement leur diamètre. Elles sont riches en myofilaments, composés d'actine et de myosine, orientés selon le grand axe de la cellule musculaire et qui sont les protéines contractiles de la cellule.

Les péricytes

Les péricytes sont des cellules contractiles spatialement isolées surtout à la surface des capillaires mais aussi au niveau des artérioles et des veinules précapillaires et entourées par de la membrane basale (Figure 15a) (Attwell et al., 2016; Dessalles et al., 2021). Contrairement aux cellules musculaires lisses, on remarque leur petit corps cellulaire rond à la surface des vaisseaux ainsi que des prolongements le long et autour de ceux-ci (Figure 15b et c). A l'instar des cellules musculaires lisses, ils expriment de l'actine et de la myosine (Lebeux and Willemot, 1978) permettant la contraction ou l'élongation de leurs prolongements qui leur confèrent des propriétés de vasoconstriction ou de vasodilatation, respectivement. Les péricytes ont aussi un rôle dans le maintien des fonctions de la barrière hématoencéphalique (Obermeier et al., 2013).

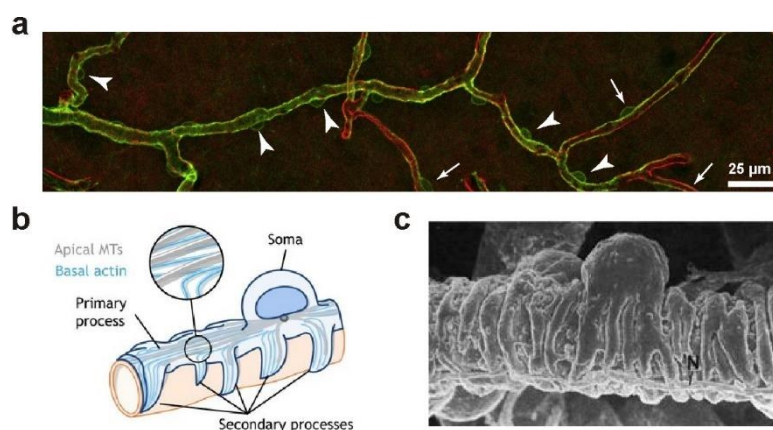


Figure 15 : Les péricytes sont les cellules contractiles des capillaires. a) Les péricytes, exprimant ici la mGFP verte, sont des cellules reposant sur la surface des capillaires (exprimant la mTomato en rouge). **b)** Ce sont des petites cellules contractiles au soma protubérant **(c)** qui étendent des prolongements sur la surface des capillaires. *Adaptées de a) Hill et al., 2015 et de b, c) Dessalles et al., 2021.*

L'unité neuro-glio-vasculaire

Les neurones, les astrocytes, les cellules endothéliales et les cellules murales s'organisent en un complexe multicellulaire que l'on nomme l'unité neuro-glio-vasculaire (Figure 16). Cette unité participe à l'homéostasie cérébrale et constitue une première ligne de défense contre les effets délétères lors d'atteintes cérébrales (Iadecola, 2004, 2017). D'un côté, la perfusion sanguine cérébrale assure un apport constant en substrat énergétique. De l'autre, les astrocytes vont soutenir l'arbre vasculaire en l'entourant quasiment complètement (Mathiisen et al., 2010; McCaslin et al., 2011) mais aussi capter les substrats énergétiques et les redistribuer aux neurones. De plus, le cerveau est capable de réguler localement la perfusion sanguine en fonction de son activité grâce aux neurones et aux astrocytes qui communiquent avec les cellules endothéliales et les cellules murales.

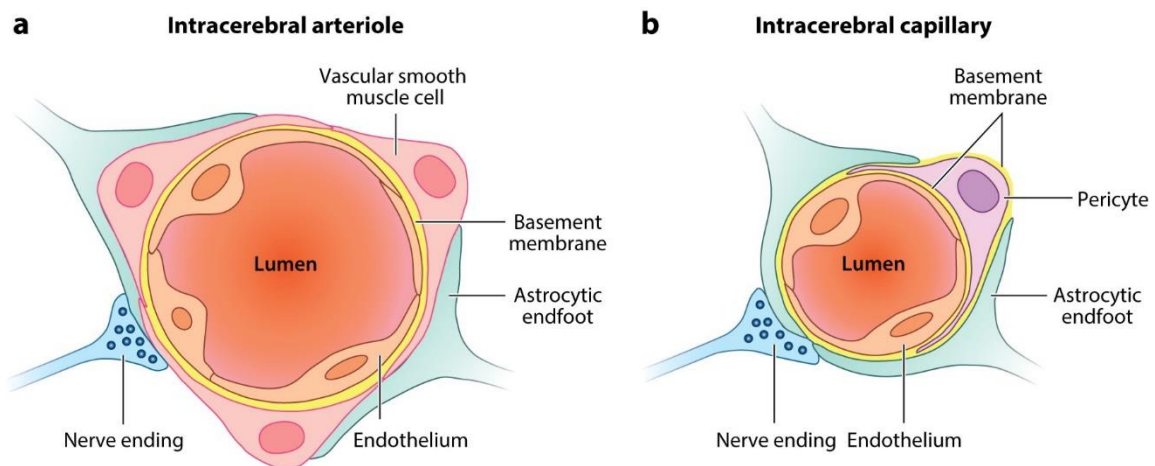


Figure 16 : Représentation schématique de l'unité neuro-glio-vasculaire. Que ce soit au niveau des artérioles (a) ou des capillaires (b), les cellules endothéliales (beige) forment l'unité neuro-glio-vasculaire par leur proximité avec les cellules musculaires lisses (rose) ou les péricytes (violet), les astrocytes (bleu) et les neurones (en bleu avec des vésicules foncées). De Andreone et al., 2015.

La régulation du flux sanguin

La loi de Poiseuille

Le flux sanguin cérébral est régulé par un ensemble de propriétés physiques du sang et des vaisseaux sanguins appelé l'hémodynamique. Ainsi, le flux peut être décrit selon la loi de Poiseuille (Figure 17) qui est la suivante :

$$Q = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta P}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

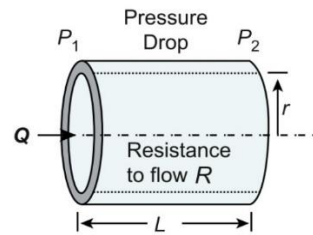


Figure 17 : Représentation de la loi de Poiseuille. De Traystman, 2017.

Le flux sanguin cérébral (Q) est dépendant de la pression de perfusion (ΔP), du rayon interne du vaisseau sanguin (r), la viscosité du sang (η) et de la longueur du vaisseau (L). Cette loi présume que le flux sanguin possède un écoulement laminaire (régulier et sans turbulences).

Si on assume que la pression, la viscosité et la longueur du vaisseau sont des valeurs constantes, le flux va être proportionnel à la puissance 4 du rayon des vaisseaux sanguins. Ainsi, une réduction de moitié du diamètre du vaisseau provoque une division par 16 du flux !

Ces changements de diamètre des vaisseaux ou vasomotricité sont réalisés par des cellules musculaires lisses ou des péricytes les entourant.

L'influence du calcium sur l'état contractile

Les changements de concentration en calcium intracellulaire vont réguler l'état contractile de ces cellules (Figure 18). Une augmentation du calcium intracellulaire provenant d'une origine extracellulaire (canaux calciques) ou intracellulaire (stock du réticulum sarcoplasmique) va induire une activation de la calmoduline activant en cascade la kinase de la chaîne légère de myosine. Alors, cette kinase peut phosphoryler les têtes des chaînes légères de myosine et provoquer un glissement adénosine triphosphate (ATP)-dépendant de la myosine sur les filaments d'actine menant à un raccourcissement des myofilaments et donc à une contraction de la cellule musculaire. La cellule musculaire lisse peut aussi se dépolariser et induire une contraction par l'action de canaux calciques voltage-dépendant (« voltage-dependent calcium channels » ou VDCC) et l'influx de calcium extracellulaire (Knot et al., 1996; Knot and Nelson, 1998). A l'inverse, une déplétion de calcium intracellulaire par une sortie de la cellule ou par pompage dans le réticulum sarcoplasmique (réticulum endoplasmique des cellules

musculaires) mène à une relaxation par déphosphorylation de la myosine et donc à un allongement des myofilaments.

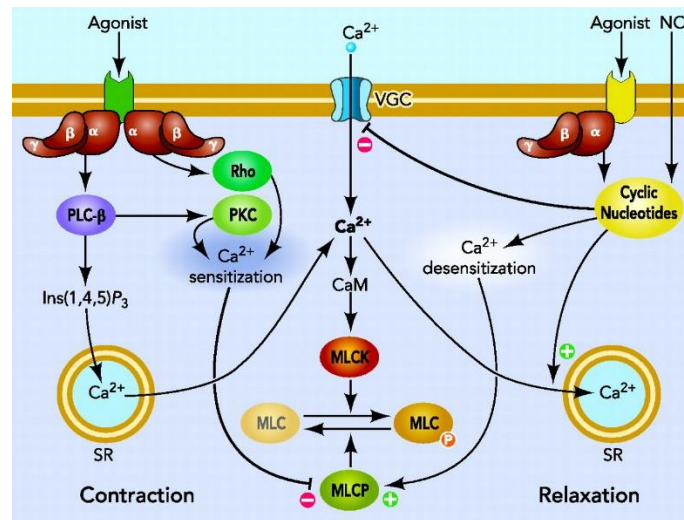


Figure 18 : La régulation de l'état contractile des cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses vont se contracter en réponse à une augmentation de calcium intracellulaire (Ca^{2+}) provenant du réticulum sarcoplasmique (SR) ou de l'extracellulaire par des canaux calciques ouverts par le voltage (VGC). Le Ca^{2+} va activer la calmoduline (CaM) activant en cascade la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). La MLCK va phosphoryler les têtes des chaînes légères de myosine (MLC) induisant la contraction. Cette contraction peut aussi être induite par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. La cellule peut aussi se relaxer par la formation de nucléotides cycliques induite par le NO ou par l'activation de récepteurs. Ces nucléotides cycliques vont provoquer la recapture du Ca^{2+} , le blocage de son influx et la désensibilisation calcique de la machinerie contractile. *De Puetz et al., 2009.*

La régulation par les nucléotides cycliques

L'état contractile de la cellule est aussi régulé par des nucléotides cycliques modulant la mobilisation du calcium et la sensibilité de la machinerie contractile au calcium (Morgado et al., 2012 pour revue) (Figure 18). L'adénosine-monophosphate cyclique (AMPc) est produit à partir d'ATP par une adénylate cyclase souvent activée par des récepteurs couplés aux protéines G. La guanosine monophosphate (GMPc) est produite à partir de la guanosine triphosphate (GTP) par une guanylate cyclase soit à la membrane et activée par des peptides natriurétiques soit par sa forme soluble pouvant être activée par le NO. L'AMPc et le GMPc vont généralement activer ensuite la protéine kinase A et la protéine kinase G, respectivement.

Ces protéines kinases vont induire une relaxation des cellules musculaires lisses au niveau du réticulum sarcoplasmique en diminuant la libération et en augmentant la séquestration du calcium et/ou en diminuant l'influx et favoriser l'efflux du calcium intracellulaire. Elles vont aussi agir en diminuant la sensibilité au calcium des éléments menant à la phosphorylation des têtes des chaînes légères de myosine ou augmenter sa déphosphorylation. Enfin, les protéines kinases vont aussi avoir un effet hyperpolarisant relaxant par l'activation de canaux potassiques favorisant la sortie de potassium de la cellule.

L'autorégulation cérébrale

L'autorégulation par le réflexe myogénique

Une caractéristique de la circulation sanguine cérébrale est de pouvoir maintenir la perfusion à un niveau approprié pour le tissu dans une gamme de pressions sanguines (Busija and Heistad, 1984). Cette autorégulation cérébrale protège ainsi la microcirculation lors de poussées hypertensives mais aussi prévient de l'ischémie lors de poussées hypotensives. L'autorégulation met en jeu un tonus myogénique des artéioles pour garder une perfusion sanguine stable en fonction de la pression artérielle, mesurée en millimètres de mercure (mmHg). Lorsque la pression artérielle est comprise entre 60 et 140 mmHg, le tonus myogénique augmente pour maintenir ainsi un flux sanguin quasiment constant et le diamètre artériolaire reste relativement constant (Osol et al., 2002). Par contre, quand la pression artérielle est en dessous de 60 mmHg (hypotension), les artéioles vont fortement se dilater pour augmenter la perfusion sanguine. Quand la pression artérielle monte au-dessus de 140 mmHg (hypertension), les artéioles vont présenter des vasodilatations forcées proportionnellement à la pression car le tonus myogénique était déjà maximal. A ce niveau de pression, le réflexe myogénique des cellules musculaires lisses ne peut plus maintenir la perfusion sanguine stable.

Ce réflexe myogénique est intrinsèque aux cellules musculaires lisses car il est toujours assuré sans l'innervation ou sans endothélium (Busija and Heistad, 1984; Davis and Hill, 1999). Il serait recruté par les changements mécaniques que subissent les cellules musculaires lisses lors des changements de pression sanguine. La déformation de la cellule pourrait activer des canaux ioniques TRP (« transient receptor potential ») sensibles à l'étirement, des récepteurs couplés aux protéines G et des VDCC permettant la dépolarisation des cellules musculaires lisses (Hill-Eubanks et al., 2014).

Grâce à l'ensemble de ces mécanismes, les cellules musculaires lisses régulent le diamètre des artérioles pour assurer une perfusion sanguine et répondre efficacement à des *stimuli* physiques et biochimiques extérieurs.

L'autorégulation dépendante de l'endothélium

L'endothélium par son contact direct avec le sang est exposé à des forces mécaniques et hémodynamiques (Krüger-Genge et al., 2019). Il va subir des contraintes d'étirements dues à la pression pariétale et des contraintes de cisaillement axiales sur la surface de l'endothélium par la friction du sang. Une augmentation de la contrainte de cisaillement par une augmentation du flux sanguin sur les cellules endothéliales va induire une vasodilatation dépendante du flux (Lehoux et al., 2006). Cette vasodilatation est induite par la production de NO par l'isoforme endothéliale de la NO synthase (eNOS ou NOS-3). En effet, cette vasodilatation dépendante du flux est abolie dans les vaisseaux sans endothélium (Thorin-Trescases and Bevan, 1998; Ward et al., 2000; Drouin and Thorin, 2009) ou lors de l'inhibition de la eNOS (Thorin-Trescases and Bevan, 1998; Drouin and Thorin, 2009). Ces contraintes de cisaillement vont induire l'activation de la eNOS par les molécules de surface permettant une transduction mécanique (Lu and Kassab, 2011) mais aussi par l'étirement du cytosquelette de la cellule et par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Liu et al., 2008b). Le NO endothélial va induire une vasodilatation par l'activation de guanylate cyclase et la production de GMPc dans les cellules musculaires lisses. Les cellules endothéliales vont aussi synthétiser des messagers vasodilatateurs comme la prostacycline I₂, des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) et vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, un des plus puissants vasoconstricteurs, et du thromboxane A₂ (Vanhoutte and Mombouli, 1996).

La régulation extrinsèque de la perfusion sanguine corticale

Le tonus vasculaire et donc la perfusion sanguine, en plus de réagir au changement de pression sanguine, sont aussi régulés par des afférences nerveuses que reçoivent les vaisseaux sanguins à la surface et à l'intérieur du néocortex (Figure 19).

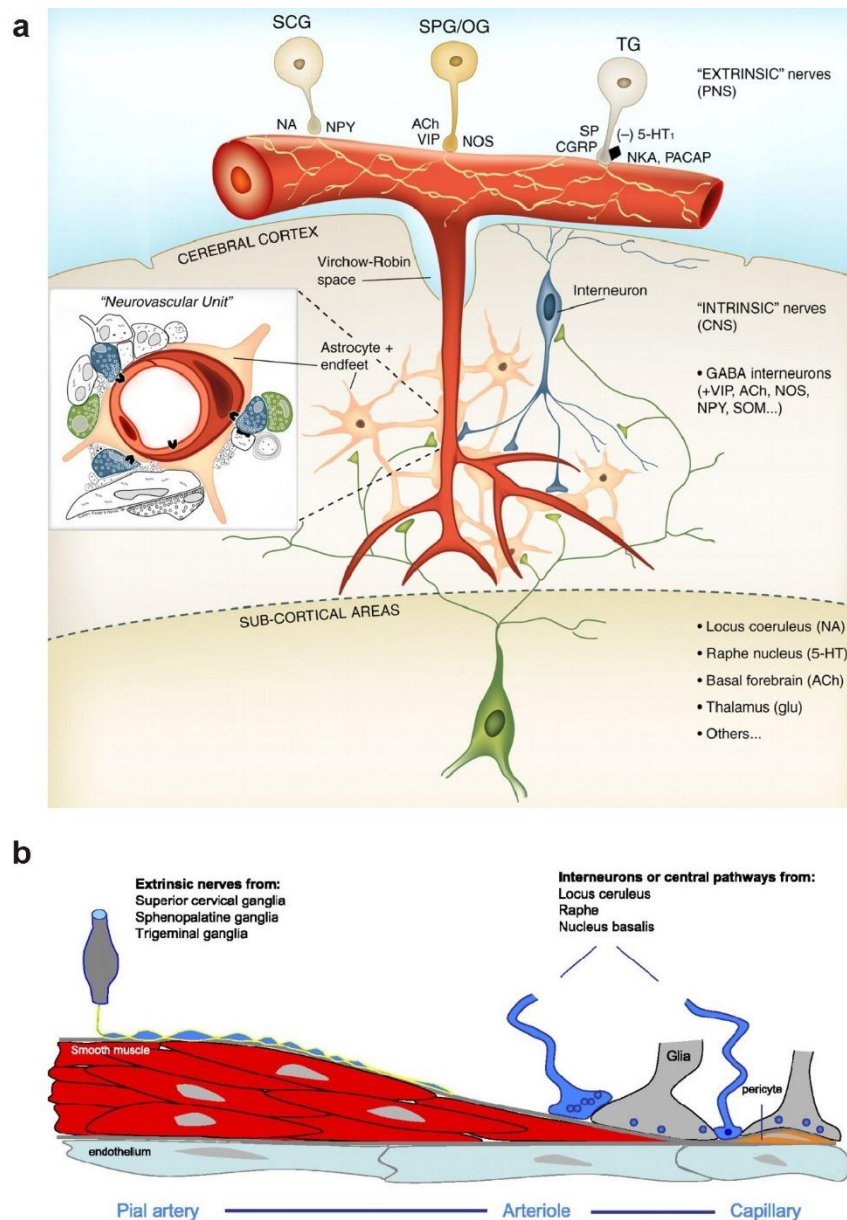


Figure 19 : Représentation schématique des afférences nerveuses reçues par le système vasculaire cortical.

Les artères piales reçoivent des afférences du système nerveux périphérique (PNS) des ganglions cervicaux supérieurs (SCG), sphéno-palatins (SPG), otiques (OG) et trigéminaux (TG). Les artères intracorticales sont innervées par des afférences du système nerveux central (CNS) qui proviennent soit des aires sous-corticales soit directement par des neurones du néocortex. b) Les neurones et les astrocytes ont une relation étroite au niveau des artérioles et des capillaires et crée l'unité neuro-glio-vasculaire (insert en (a)). On peut noter la diminution de la couche de cellules musculaires lisses des artères piales jusqu'aux artérioles pour ensuite laisser place à des péricytes. De a) Hamel, 2006 et b) Girouard and Iadecola, 2006.

Les vaisseaux sanguins piaux vont recevoir trois types d'« innervations extrinsèques » (Girouard and Iadecola, 2006; Hamel, 2006). Une innervation orthosympathique vasoconstrictrice par la libération de NPY du ganglion cervical supérieur et une innervation

parasympathique vasodilatatrice par la libération d'acétylcholine, de NO et de VIP des ganglions sphéno-palatin et otique. Il y a aussi une innervation sensorielle par libération de peptide relié au gène calcitonine (CGRP), de substance P, de neurokinine A et de polypeptide activateur de l'adénylate-cyclase hypophysaire du ganglion trigéminal qui pourrait être impliquée dans les migraines à aura (Bolay et al., 2002a). Lors de leur entrée dans le parenchyme et lorsque l'espace de Virchow-Robin disparaît, les vaisseaux sanguins vont peu à peu perdre cette « innervation extrinsèque » au profit d'une « innervation intrinsèque ».

La régulation intrinsèque de la perfusion sanguine corticale

L'« innervation intrinsèque » provient d'afférences sous-corticales mais aussi intracorticales (Iadecola, 2004; Girouard and Iadecola, 2006; Hamel, 2006) (Figure 19). Les afférences sous-corticales proviennent de voies sérotoninergiques du raphé, noradrénergiques du locus coeruleus, dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et cholinergiques du télencéphale basal. Elles vont cibler directement l'arbre vasculaire mais aussi les éléments cellulaires qui l'entourent comme les astrocytes. Les neurones du néocortex ont aussi la capacité de contrôler le tonus vasculaire par la libération de messagers vasoactifs. En effet, ils peuvent présenter des appositions périvasculaires, généralement des dendrites, et la plupart du temps, séparées par le feuillet astrocytaire (Estrada et al., 1993; Abounader and Hamel, 1997; Estrada and DeFelipe, 1998; Wang et al., 2004, 2005).

- **L'unité neuro-glio-vasculaire** est créée par l'étroite relation morphologique et fonctionnelle qu'entretiennent les neurones, les astrocytes, les cellules murales et endothéliales.
- **Les neurones** : spécialisés dans la transmission de l'influx nerveux avec une grande hétérogénéité morphologique et moléculaire.
- **Les astrocytes** : cellules gliales les plus nombreuses, en contact avec les neurones et les vaisseaux sanguins, régulateurs de la transmission synaptique, du flux sanguin et du métabolisme cérébral.
- **Les cellules musculaires lisses et les péricytes** : éléments contractiles des vaisseaux sanguins et senseurs et régulateurs de la perfusion sanguine.
- **Les cellules endothéliales** : unités de la barrière hématoencéphalique en contact direct avec le sang et senseurs et régulateurs de la perfusion sanguine.

Le couplage neurovasculaire

La naissance du concept de couplage neurovasculaire

A la fin du 19^{ème} siècle, le physiologiste italien Angelo Mosso émit en pionnier l'hypothèse que des tâches cognitives ou attentionnelles pouvaient changer localement la perfusion sanguine cérébrale et donc le volume cérébral à la suite de changements fonctionnels du néocortex (l'article original en italien : [Mosso Angelo, 1880](#) et pour revue : [Raichle, 2006](#); [Sandrone et al., 2014](#)). Pour vérifier son hypothèse, il a enregistré les pulsations du néocortex sur des personnes ayant des défauts crâniens ou ayant subi une neurochirurgie. Il réalisa ces enregistrements grâce au pléthysmographe ([Figure 20a](#)), un appareil qu'il posa sur le cuir chevelu où le crâne est absent pour mesurer les changements de volume lors des tâches cognitives et attentionnelles ([Figure 20b](#)).

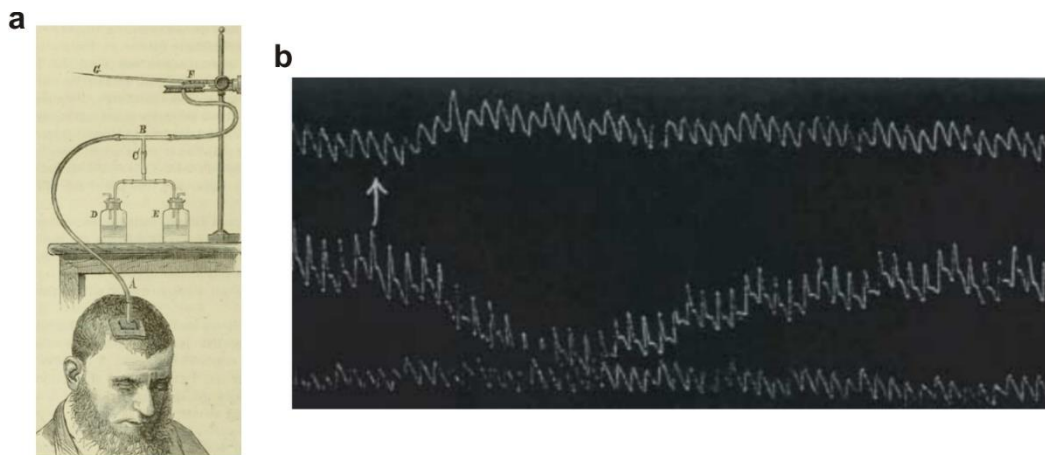


Figure 20 : Les débuts de l'étude du fonctionnement cérébral au travers du couplage neurovasculaire par Angelo Mosso. a) Angelo Mosso utilisait un pléthysmographe pour mesurer les changements de volume du cerveau à la suite de tâches cognitives ou attentionnelles chez des patients présentant un défaut crânien. **b)** Il va aussi observer des changements de volume cérébral liés aux émotions. L'énonciation de ces impressions, en quelques mots, sur la femme du patient par Mosso (flèche) provoque une augmentation du volume cérébral (trace supérieure) et une diminution du volume dans les pieds (trace médiane). *Adaptées de (a) Mosso Angelo, 1880, et de (b) Iadecola, 2004.*

Mais la première observation de la relation physiologique réelle entre l'activité cérébrale et la perfusion sanguine est introduite par Charles Roy et Charles Sherrington en 1890 ([Roy and Sherrington, 1890](#)). Ils montrèrent que l'injection de l'extrait de cerveau dans le sang via la carotide commune était capable d'induire une « expansion » cérébrale sans montée de la pression artérielle ([Figure 21](#)).

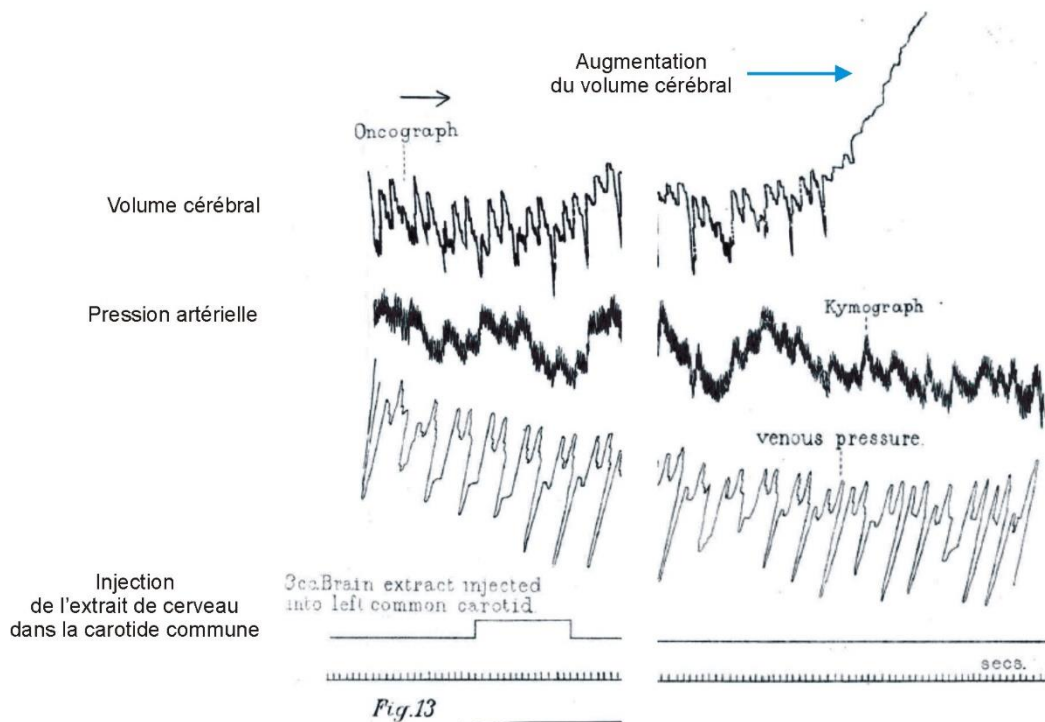


Figure 21 : Observation d'un couplage neurovasculaire par Roy et Sherrington. L'introduction dans la carotide commune gauche d'un animal d'un extrait cérébral provenant d'un autre animal décédé depuis peu (trace du bas) va provoquer une augmentation du volume cérébral, visible par une augmentation sur l'oncographe jusqu'à sortir de la zone de traçage de l'appareil, (trace du haut) et sans affecter la pression artérielle, représentée sur le kymographe (trace supérieure du milieu). Cette expérience mena Roy et Sherrington à la conclusion que des substances sécrétées dans le cerveau après la mort sont capables de dilater les vaisseaux sanguins cérébraux. *Adaptée de Roy and Sherrington, 1890.*

Ainsi, Roy et Sherrington posèrent l'hypothèse que des métabolites cérébraux sécrétés dans le cerveau étaient capables de provoquer une dilatation des vaisseaux sanguins cérébraux et postulèrent l'hypothèse suivante :

“Bearing in mind that strong evidence exists of localisation of function in the brain, we are of opinion that an automatic mechanism [...] is well fitted to provide for a local variation of the blood-supply in accordance with local variations of the functional activity.”

ROY AND SHERRINGTON, 1890

On a donc ici la première définition du couplage neurovasculaire comme d'un mécanisme permettant des variations locales de perfusion sanguine en accord avec les variations locales de l'activité cérébrale.

Mais pendant plusieurs années, il n'y a plus eu d'avancées sur l'étude du couplage neurovasculaire par manque de moyens techniques mais aussi par l'influence et les expériences de Leonard Hill qui ne montrèrent aucune relation entre l'activité cérébrale et la perfusion sanguine (Hill, 1896).

De nouvelles évidences d'un possible couplage entre l'activité neuronale et une augmentation de la perfusion sanguine, localement, ne viennent que bien plus tard via l'observation d'un cas clinique par John Fulton (Fulton, 1928). Par la suite, des expériences réalisées sur l'animal ont montré que des stimulations visuelles induisent une augmentation de la température, interprétée comme un indicateur de perfusion sanguine, dans le cortex visuel (Schmidt and Hendrix, 1938). Afin d'observer plus directement ces changements de perfusion sanguine, Seymour Kety et Carl Schmidt mesurèrent quantitativement la perfusion sanguine cérébrale grâce au protoxyde d'azote, un gaz supposé physiologiquement inerte et utilisé comme traceur, dans le cerveau entier (Kety and Schmidt, 1945, 1948). L'essor de la technique de traceurs diffusibles et de l'autoradiographie permit ensuite de fournir l'évidence que l'activité neuronale provoquait une augmentation de perfusion sanguine restreinte aux zones cérébrales activées (Freygang and Sokoloff, 1959). C'est finalement Lassen et ses collègues qui vont donner naissance aux techniques d'imagerie cérébrale modernes en mesurant des changements de flux sanguins dans des zones spécifiques du néocortex par artériographie cérébrale à rayons X après l'injection d'un isotope radioactif et à la suite de stimuli sensoriels ou de mouvements volontaires (Lassen et al., 1978).

L'ensemble de ces recherches a confirmé l'existence d'un lien entre l'activité neuronale et la perfusion sanguine locale.

Les bases du couplage neurovasculaire

Il est désormais admis que le couplage neurovasculaire est défini par un lien étroit entre l'activité neuronale et la perfusion sanguine cérébrale. La combinaison d'enregistrements électrophysiologique et hémodynamique montre que les réponses hémodynamiques vont corrélérer avec les changements d'activité neuronale en condition physiologique (Logothetis et

al., 2001; Niessing et al., 2005). La réponse hémodynamique (Figure 22a et b) se compose de vasodilatations et de vasoconstrictions (Figure 22c). Une augmentation de l'activité neuronale va induire une augmentation de la perfusion sanguine cérébrale nommée hyperémie fonctionnelle, sous-tendue par des vasodilatations. Elle est temporellement et spatialement restreinte par des vasoconstrictions terminant la réponse hyperémique et prédominantes autour de la zone activée (Devor et al., 2007). Ces vasoconstrictions pourraient expliquer l'hypoperfusion à proximité de l'aire activée (Shmuel et al., 2002; Boorman et al., 2010).

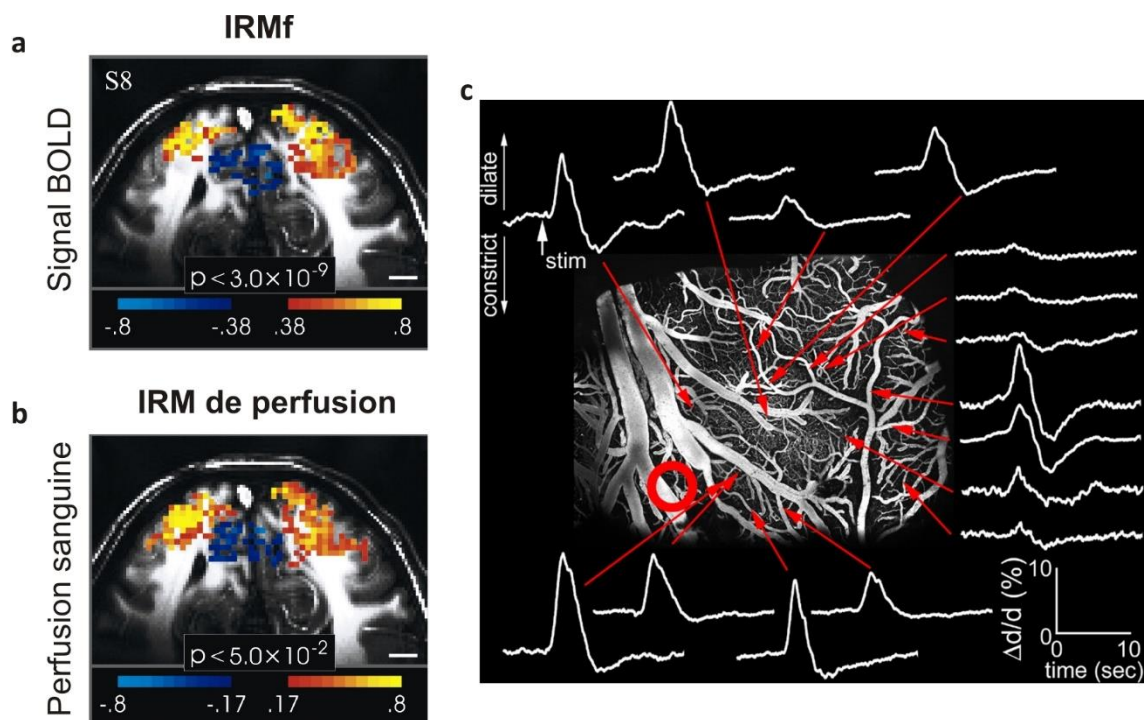


Figure 22 : La réponse vasculaire à l'activité neuronale. a) Un stimulus visuel va induire une activité neuronale dans le cortex visuel associée avec une augmentation du signal BOLD (en jaune-orange) en IRM fonctionnelle (IRMf) corrélée (b) à une augmentation de la perfusion sanguine (en jaune-orange) visible en IRM de perfusion. C'est l'hyperémie fonctionnelle. Autour de la zone d'activité, on observe une diminution du signal BOLD et de la perfusion sanguine (bleu). c) L'observation en microscopie biphotonique permet d'observer les changements de diamètre ($\Delta d/d$) en fonction du temps. L'activité neuronale évoquée par une stimulation sensorielle (flèche blanche, « stim ») et représentée le cercle rouge provoque une vasodilatation des artéioles superficielles au niveau de la zone activée suivie par une vasoconstriction. Plus on s'éloigne de la zone d'activité, plus les vasoconstrictions sont prédominantes. Adaptée de (a,b) Shmuel et al., 2002 et de (c) Devor et al., 2007.

En plus de cette augmentation de la perfusion sanguine locale, l'activité neuronale va induire une augmentation de l'utilisation locale du glucose sanguin. Ce couplage entre l'activité neuronale et l'utilisation de glucose est appelé couplage neurométabolique.

Les couplages neurométabolique et neurovasculaire sont à la base des signaux visualisés par des techniques d'imagerie cérébrale fonctionnelle (Raichle and Mintun, 2006; Logothetis, 2008) utilisées à des fins de diagnostic en clinique et qui sont devenues fondamentales dans la recherche en neurosciences cognitives.

L'imagerie mésoscopique du couplage neurovasculaire

La tomographie par émission de positons et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle sont les outils d'imagerie cérébrale fonctionnelle les plus couramment utilisés en santé. Ils permettent de cartographier l'activité neuronale chez les personnes saines ou malades en suivant les changements hémodynamiques.

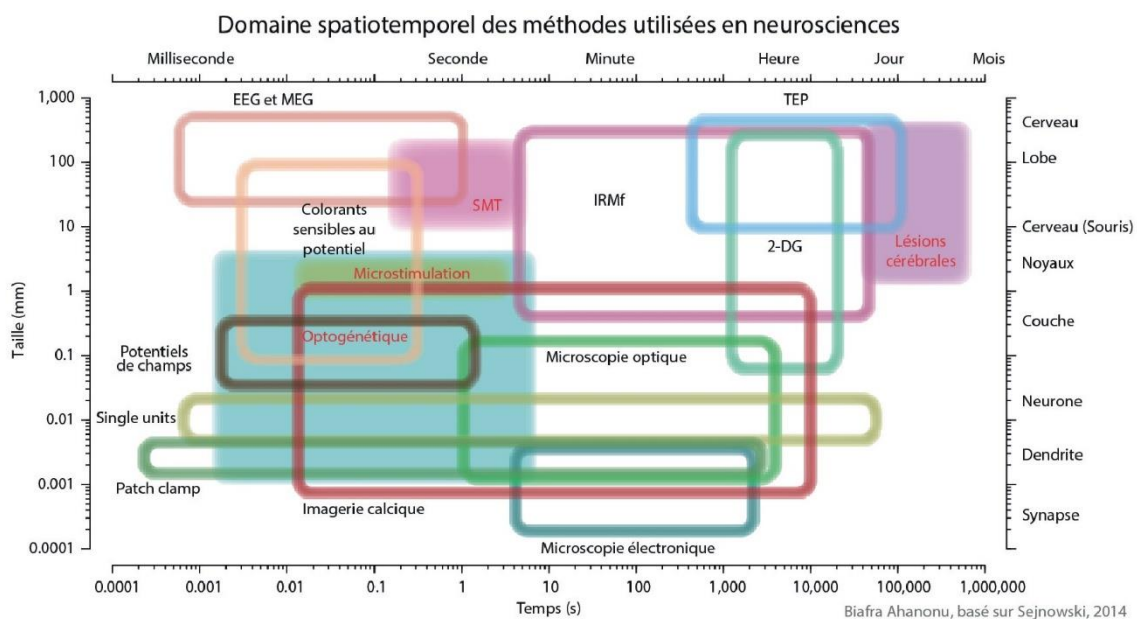


Figure 23 : La résolution spatio-temporelle des principales techniques utilisées en neurosciences. Ce graphique représente la résolution spatiale et la structure observable en fonction de la résolution temporelle des différents outils utilisés en recherche et en clinique. Les techniques de mesures sont les régions ouvertes avec le nom en noir et les techniques de « perturbation » sont les régions pleines avec le nom en rouge. EEG : électroencéphalographie ; MEG : magnétoencéphalographie ; TEP : Tomographie par émission de positons ; SMT : stimulation magnétique transcrânienne ; 2-DG : 2-désoxyglucose. *Adaptée d'un graphique de Biafra Ahanonu basé sur Sejnowski et al., 2014. Source : <https://bahanonu.com/syscarut/articles/212/>*

La tomographie par émission de positons

La tomographie par émissions de positons ou TEP permet de mesurer au moyen de différents radiotraceurs émetteurs de positons (β^+) les changements hémodynamiques, l'utilisation de l'oxygène ou du glucose (Raichle and Mintun, 2006). Quand l'isotope d'un radiotraceur se désintègre, il va émettre des positons qui vont entrer en collision avec des électrons, s'annihiler et émettre deux photons γ dans des directions diamétralement opposées. Ces photons sont captés par les détecteurs entourant la tête et on va ainsi pouvoir cartographier la distribution cérébrale de radiotraceurs en fonction du temps. La résolution spatio-temporelle de la TEP est limitée par la diffusion et la demi-vie des isotopes utilisés (Figure 23).

Fox et Raichle ont utilisé cette technique chez l'être humain avec une combinaison d'injection d'eau et d'inhalation de traces de monoxyde de carbone et de dioxygène, tous marqués à l'oxygène 15, pour mesurer la perfusion sanguine cérébrale et la consommation d'oxygène par le tissu (taux métabolique cérébral d' O_2) (Fox and Raichle, 1986). Ils ont observé au repos une bonne corrélation entre la perfusion sanguine cérébrale et le taux métabolique cérébral. Cependant, un stimulus va provoquer une augmentation locale de la perfusion sanguine près de six fois supérieure à l'augmentation concomitante du taux métabolique cérébral d' O_2 . Ce découplage entraîne une augmentation locale de la disponibilité en O_2 (Figure 24) modifiant les propriétés magnétiques et optiques de l'hémoglobine.

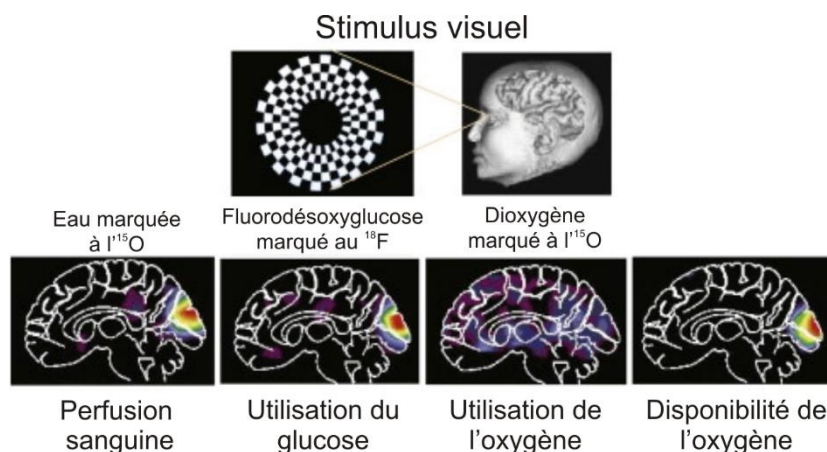


Figure 24 : L'imagerie cérébrale fonctionnelle grâce à la tomographie par émission de positons. Une activité neuronale induite par une stimulation visuelle va provoquer une augmentation de la perfusion sanguine et de l'utilisation du glucose plus élevées que l'utilisation de l'oxygène. Il en résulte d'une augmentation de la disponibilité en oxygène qui va modifier les propriétés magnétiques et optiques de l'hémoglobine. *Adaptée de Raichle and Mintun, 2006.*

Ces modifications vont pouvoir être suivies par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle ou spectroscopique de l'hémoglobine pour cartographier l'activité neuronale. L'utilisation de fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18 permet par ailleurs le suivi de l'augmentation de l'utilisation du glucose induit lors du couplage neurométabolique.

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est une variante de l'IRM utilisant des champs magnétiques puissants pour générer des images d'organes. On la retrouve en routine en milieu hospitalier et c'est devenu la technique non-invasive de choix de la neuroimagerie en recherche (Logothetis, 2008 pour revue).

L'IRMf basée sur le signal BOLD, pour « blood-oxygen level dependent », mesure le taux d'oxygénation sanguin qui influence la susceptibilité magnétique de l'hémoglobine. La désoxyhémoglobine (hémoglobine non-liée à l'oxygène) est paramagnétique et interfère avec le champ magnétique appliqué alors que l'oxyhémoglobine (hémoglobine liant l'oxygène) est diamagnétique et n'interfère que très peu. Les changements du taux d'oxygénation sanguin dépendent des variations de volume, de flux sanguin, de l'hématocrite et de l'extraction de l'O₂ par le métabolisme (Ogawa and Lee, 1990; Ogawa et al., 1990). Ainsi, on peut suivre l'hyperémie fonctionnelle par la diminution des interférences magnétiques produite par la diminution du niveau relatif de désoxyhémoglobine par rapport à l'oxyhémoglobine lors de l'afflux sanguin artériel et ainsi localiser la zone cérébrale activée (Figure 22a).

On peut aussi noter la technique de marquage des spins artériels en IRMf qui consiste à marquer l'eau sanguine par des pulsations de radiofréquence au niveau du cou et à mesurer la perfusion sanguine cérébrale de cette eau marquée (Shmuel et al., 2002) (Figure 22b).

L'imagerie spectroscopique fonctionnelle

En plus d'un changement de susceptibilité magnétique, le spectre d'absorption de lumière de l'hémoglobine est aussi modifié en fonction de sa liaison à l'oxygène. On peut suivre les changements de volume et de taux d'oxygénation sanguins en fonction des propriétés d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la désoxyhémoglobine dans le spectre visible (500-600 nm) et proche de l'infrarouge (700-900 nm) par l'imagerie spectroscopique (Devor et al., 2007)(Izzetoglu et al., 2005 pour revue).

L'imagerie par ultrasons fonctionnelle

L'hyperémie fonctionnelle est aussi visible par les changements locaux du volume cérébral sanguin qui augmente lors de vasodilatations mesurables par effet Doppler grâce à l'utilisation d'ultrasons (Macé et al., 2011). La haute résolution spatiale (< 250 µm) de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons ou « fUS » (« fonctionnal ultrasound ») permet d'étudier la connectivité fonctionnelle entre différentes aires corticales et sous-corticales avec une meilleure résolution temporelle que l'IRMf. Cette imagerie est toutefois limitée à un seul plan à la fois et par la faible perméabilité aux ultrasons du crâne. Elle nécessite généralement un accès direct au cerveau pour l'envoi des ultrasons et est donc essentiellement possible en expérimentation animale ou neurochirurgie. Récemment, cette technique d'imagerie a quand même pu être réalisée au niveau de la fontanelle de nouveau-nés (Demene et al., 2017; Deffieux et al., 2021). Ainsi, cette technique ouvre la possibilité de détecter précocement les anomalies développementales du cerveau.

L'ensemble de ces techniques vont suivre indirectement l'activité neuronale en mesurant les changements hémodynamiques. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la réponse hémodynamique pour correctement les interpréter.

L'imagerie microscopique du couplage neurovasculaire

Les mécanismes cellulaires et moléculaires du couplage neurovasculaire sont généralement étudiés chez l'animal grâce à des préparations *ex vivo* de tranches de cerveau ou de rétine isolées et grâce à des préparations *in vivo* utilisant la microscopie biphotonique au travers d'une fenêtre crânienne (Iadecola and Nedergaard, 2007). Ces techniques d'imagerie permettent une résolution micrométrique (Figure 23).

Les préparations *ex vivo* de tranches de cerveau et de rétines isolées

Les préparations de tranches de cerveau et de rétines isolées sont des tissus issus de la coupe de cerveau et de la dissection d'œil et maintenus vivants dans des liquides physiologiques appropriés. Ces préparations *ex vivo* permettent de réaliser l'électrophysiologie, l'imagerie et la manipulation pharmacologique des neurones, de la glie et des vaisseaux sanguins. L'imagerie de la réactivité vasculaire en temps réel est possible par la vidéomicroscopie de transmission et de fluorescence (Sagher et al., 1993; Mishra et al., 2014) (Figure 25). La

possibilité de contrôler la composition des liquides physiologiques facilite les approches pharmacologiques est un grand avantage des préparations *ex vivo* permettant de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le couplage neurovasculaire.

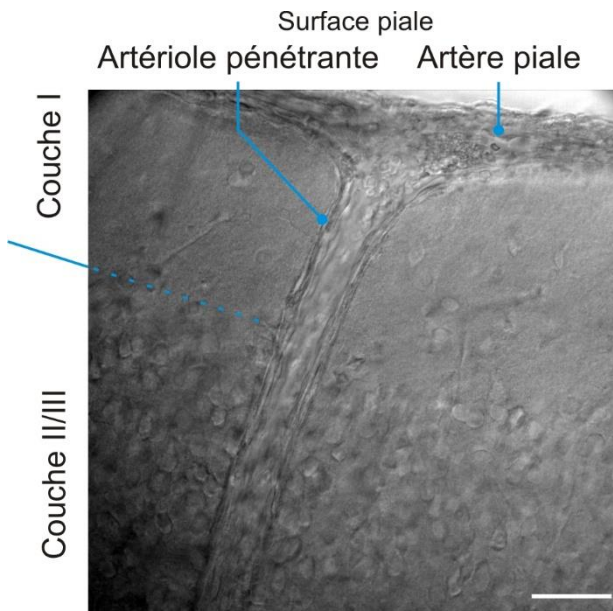


Figure 25 : Exemple d'une préparation *ex vivo* d'une tranche de néocortex de souris. Les contours des artérioles pénétrantes et des neurones sont bien définis par vidéomicroscopie à infrarouge avec un contraste à gradient de Dodt. Cette technique permet, par exemple, de réaliser l'électrophysiologie des neurones, de la réactivité vasculaire à une drogue ou l'analyse des réponses vasculaires à une activation neuronale. Barre d'échelle : 50 μm .

Ces préparations *ex vivo* nécessitent une dissection qui va engendrer des dommages tissulaires pouvant affecter les réponses neuronales et vasculaires. De plus, les vaisseaux sanguins observés ne présentent plus de perfusion sanguine et n'ont donc pas le tonus vasculaire induit par la pression et le flux de la perfusion. Ce tonus affecte les réponses vasculaires et peut déterminer, pour un stimulus donné, si le vaisseau sanguin va se dilater ou se contracter (Armstead et al., 1989; Blanco et al., 2008). Les vaisseaux peuvent être canulés et perfusés *in situ* pour rétablir un flux mais cette technique est difficile à mettre en place et nécessite du matériel supplémentaire (Kim et al., 2012).

Les préparations *in vivo* utilisant la microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique permet l'imagerie de fluorescence par l'excitation simultanée d'un fluorophore par deux photons. L'observation et l'excitation sont réalisées au travers d'une fenêtre crânienne sur des animaux anesthésiés ou vigiles. La microscopie biphotonique offre ainsi la possibilité de réaliser des stimulations physiologiques et d'étudier le couplage neurovasculaire *in vivo* avec un réseau vasculaire normalement perfusé (Devor et al., 2008; Nizar et al., 2013) (Figure 22c). Elle permet le suivi des changements de diamètre des vaisseaux mais aussi du flux sanguin cérébral (Figure 26).

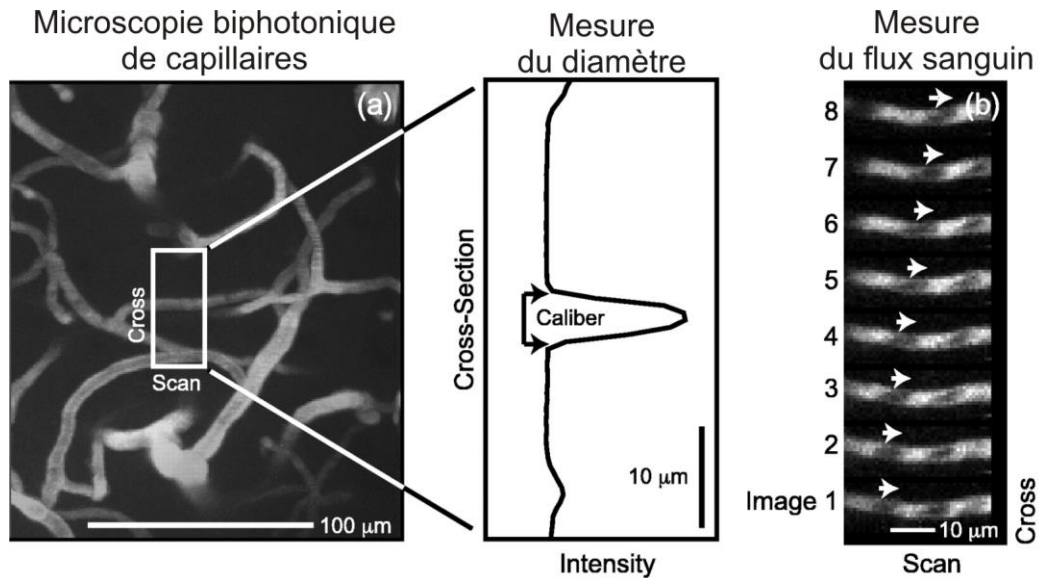


Figure 26 : La mesure du diamètre luminal et du flux sanguin par microscopie biphotonique. a) L'injection de sérum contenant un fluorophore permet de visualiser les vaisseaux sanguins cérébraux et ainsi (insert) de mesurer leur diamètre par suivi du profil d'intensité de fluorescence. **b)** De plus, en suivant la position des hématies présentes non-colorées dans le sang, on peut suivre le changement de flux sanguin. *Adaptée de Kleinfeld et al., 1998.*

La réalisation de la fenêtrage crânienne va altérer la pression intracrânienne et donc la perfusion sanguine cérébrale. De plus, c'est une technique invasive qui requiert en aigu l'utilisation d'anesthésiques pouvant aussi avoir un effet sur la perfusion sanguine et sa régulation (Sloan, 2002). Cette limitation est toutefois levée par l'implantation de la fenêtrage crânienne chronique chez l'animal vigile. Ces approches nécessitent donc une surveillance des constantes physiologiques comme la pression artérielle moyenne, la respiration de l'animal et la saturation en O₂ pour étudier le couplage neurovasculaire dans des conditions les plus proches de la normale.

L'avènement de l'imagerie microscopique a permis des avancées scientifiques majeures apportant une meilleure compréhension des mécanismes du couplage neurovasculaire.

Les différentes hypothèses des mécanismes du couplage neurovasculaire

Deux hypothèses majeures sont proposées pour expliquer les mécanismes du couplage neurovasculaire : le flux sanguin serait régulé soit par les métabolites produits par l'activité neuronale ou hypothèse rétrograde soit par la libération de messagers vasoactifs par les

neurones et les astrocytes ou hypothèse antérograde (Attwell and Iadecola, 2002; Iadecola, 2004, 2017; Girouard and Iadecola, 2006; Attwell et al., 2010).

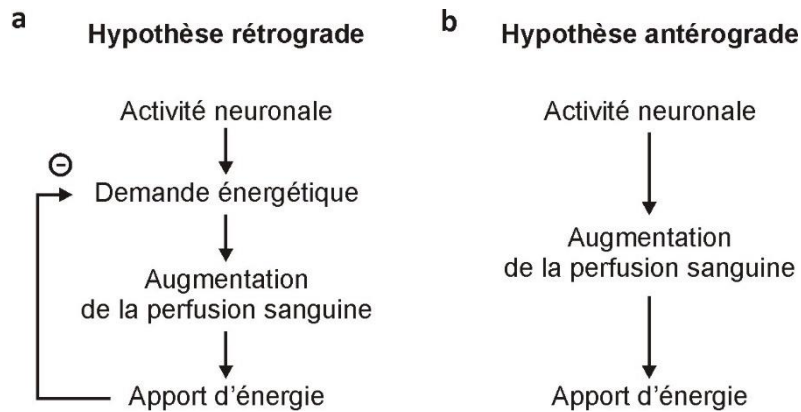


Figure 27 : Les deux hypothèses majeures des mécanismes du couplage neurovasculaire. **a)** Selon l'hypothèse rétrograde, c'est la demande énergétique créée par l'activité neuronale qui va induire une augmentation de la perfusion sanguine et ainsi subvenir aux besoins énergétiques. **b)** L'hypothèse antérograde soutient une action directe concomitante à l'activité neuronale permettant l'augmentation de la perfusion sanguine et l'apport d'énergie. *Adaptée de Attwell et al., 2010.*

L'hypothèse rétrograde

L'activité neuronale consomme de l'oxygène et du glucose essentiellement via la pompe Na^+/K^+ ATPase pour maintenir les gradients ioniques dissipés lors de la transmission synaptique et les potentiels d'action. On estime qu'elle consomme 50 à 80 % de l'ATP (Attwell and Laughlin, 2001; Attwell and Iadecola, 2002). C'est plus particulièrement, l'activité synaptique qui demande plus d'énergie métabolique que l'émission de potentiels d'action et est mieux couplé au changement de perfusion sanguine (Logothetis et al., 2001; Logothetis, 2007). La production et l'utilisation de l'ATP par le métabolisme ainsi que les sous-produits de l'activité neuronale vont induire une augmentation de la perfusion sanguine et un apport en O_2 et en glucose qui permettraient de répondre à la demande énergétique accrue. Cette hypothèse va dans le sens de celle de Roy et Sherrington d'une régulation de la perfusion sanguine par des métabolites cérébraux (Roy and Sherrington, 1890).

Parmi ces métabolites, le lactate produit par le métabolisme du glucose et capté par les cellules endothéliales et entraîne une vasodilatation par la production et libération de NO (Hein et al., 2006). L'acidification du milieu, notamment lors de l'activité métabolique, va également induire une vasodilatation (Kuschinsky et al., 1972; Kim and Filosa, 2012).

L'adénosine produite lors de la dégradation de l'ATP contribue aussi à la réponse hyperémique induite par l'activité neuronale (Ko et al., 1990). Lors d'une activation neuronale soutenue, la déplétion de l'ATP induit l'activation de canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) au niveau des cellules musculaires lisses induisant leur hyperpolarisation et leur relaxation (Faraci and Sobey, 1998; Nguyen et al., 2000).

Ce modèle s'appuie sur une régulation de la perfusion sanguine en réponse à la demande énergétique induite par l'activité neuronale (Figure 27a). Cependant, l'observation d'un couplage neurovasculaire normal en présence d'un excès de glucose et d'oxygène (Wolf et al., 1997; Lindauer et al., 2010) remet en question la validité d'un mécanisme de rétrocontrôle par la demande énergétique.

L'hypothèse antérograde

Le glutamate, libéré durant l'activité synaptique, active les récepteurs NMDA et AMPA post-synaptiques des neurones et des astrocytes ce qui conduit l'augmentation de calcium intracellulaire (Lind et al., 2013, 2018) et ainsi induit l'activation de voies calcium-dépendantes productrices et/ou libératrices de messagers vasoactifs. Dans cette hypothèse antérograde, les neurones et/ou les astrocytes vont contrôler directement la perfusion sanguine indépendamment de la demande énergétique (Lauritzen, 2005; Hamel, 2006; Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010, 2018) (Figure 27b et 28).

La régulation de la perfusion sanguine par les neurones

L'augmentation intracellulaire de calcium permet l'activation d'enzymes comme la NO synthase (NOS) présente dans les neurones (Bredt et al., 1990). Le NO est le premier messager découvert qui participe à la réponse hyperémique (Northington et al., 1992). Il va être synthétisé par les neurones en réponse à l'activité synaptique (Faraci and Breese, 1993; Ayata et al., 1996; Ma et al., 1996) et être responsable de près de la moitié de la réponse hyperémique à la suite d'une stimulation sensorielle (Dirnagl et al., 1993; Irikura et al., 1994; Cholet et al., 1996; Bonvento et al., 2000; Girouard et al., 2007). La capacité des interneurones GABAergiques à SOM et à NPY à exprimer la NOS (Kubota et al., 1994; Gabbott et al., 1997; Karagiannis et al., 2009) et à induire des vasodilatations (Cauli et al., 2004) en fait de bons candidats pour la réponse hyperémique induite par le NO.

De plus, les interneurones GABAergiques vont aussi produire des neuropeptides vasodilatateurs comme le VIP (Itakura et al., 1987; Yaksh et al., 1987) et vasoconstricteurs comme le NPY (Tuor et al., 1990; Abounader et al., 1995; Cauli et al., 2004) et la SOM, dans une moindre mesure (Long et al., 1992; Cauli et al., 2004) libérés par exocytose lors d'augmentation de calcium intracellulaire et qui vont agir directement sur les cellules musculaires lisses qui expriment leurs récepteurs (Abounader et al., 1995, 1999; Bao et al., 1997; Fahrenkrug et al., 2000; Cauli et al., 2004).

Les vasodilatation et l'hyperémie induites par l'activation spécifique des interneurones GABAergiques confirment leur rôle essentiel dans le couplage neurovasculaire (Anenberg et al., 2015; Uhlirova et al., 2016; Krawchuk et al., 2020) et leurs propriétés inhibitrices et vasoconstrictrices suggèrent leur implication dans la baisse d'activité neuronale associée aux vasoconstrictions observées en périphérie de la zone activée (Shmuel et al., 2002, 2006; Devor et al., 2007).

Les neurones pyramidaux sont centraux dans la réponse hyperémique par les prostaglandines et les prostacyclines qu'ils produisent. Une activité neuronale, déclenchée par une stimulation sensorielle, entraîne une réponse hyperémique dépendante de l'activité de la cyclooxygénase de type-2 (COX-2) exprimée constitutivement dans les neurones pyramidaux (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). C'est plus précisément par la synthèse de prostaglandine E2 (PGE2) et de prostacycline I2 (PGI2) dérivées de la COX-2 que les neurones pyramidaux vont induire cette réponse hyperémique (Lacroix et al., 2015). La PGE2 et la PGI2 sont des prostanoides produits à partir de l'acide arachidonique libéré de la membrane plasmique par des phospholipases activées par le calcium intracellulaire. Elles induisent une vasodilatation en agissant sur les récepteurs EP2 et EP4 pour la PGE2 et le récepteur IP pour la PGI2. Étonnamment, la PGE2 induit *ex vivo* des vasodilatations à faibles concentrations et des vasoconstrictions à de plus fortes concentrations en agissant sur ses récepteurs EP1 et EP3 (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). Ceci suggère que la PGE2 pourrait jouer un rôle complexe dans le couplage neurovasculaire.

Différents types de neurones sont donc capables d'augmenter ou de diminuer la perfusion sanguine en produisant des messagers vasoactifs divers.

La régulation de la perfusion sanguine par les astrocytes

Ils sont des candidats idéaux à la régulation du flux sanguin par leurs appositions au niveau de la synapse et des vaisseaux sanguins (Iadecola and Nedergaard, 2007; McCaslin et al., 2011) et vont activement participer au couplage neurovasculaire (Attwell et al., 2010; Mishra, 2017; Cauli and Hamel, 2018). La libération de glutamate lors de la transmission synaptique provoque une augmentation rapide de calcium intracellulaire dans les pieds astrocytaires associée à une augmentation de la perfusion sanguine (Lind et al., 2013, 2018).

Cette augmentation calcique au niveau des pieds astrocytaires peut induire une libération locale de K^+ par leurs canaux potassiques de grande conductance sensibles au calcium (canaux BK) (Filosa et al., 2006). La quantité de K^+ libérée dépend du niveau d'activité neuronale et de l'augmentation du calcium intracellulaire des astrocytes (Girouard et al., 2010). Une élévation modérée du K^+ extracellulaire (3-20 mM) va augmenter la conductance apparente des canaux potassiques correcteurs entrants (K_{ir}) des cellules musculaires, provoquer leur hyperpolarisation et induire leur relaxation et une vasodilatation (Knot et al., 1996; Filosa et al., 2006; Girouard et al., 2010). Une élévation du K^+ supérieure à 20 mM, va affecter substantiellement le potentiel d'inversion des ions K^+ , entraînant une dépolarisation des cellules musculaires lisses, une activation de leur VDCCs, un influx calcique et leur contraction des cellules musculaires lisses et provoquer une vasoconstriction (Sagher et al., 1993; Horiuchi et al., 2002; Girouard et al., 2010).

De plus, l'augmentation calcique intracellulaire entraîne l'activation de phospholipases permettant une libération de la membrane de l'acide arachidonique et la production et la libération d'un dérivé de la cyclooxygénase de type-1 (COX-1), possiblement la PGE₂, (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Mishra et al., 2016) et d'acides époxyeicosatriénoïques (EETs) par des cytochromes P450 époxygénases (Alkayed et al., 1996; Bhardwaj et al., 2000; Peng et al., 2002, 2004; Liu et al., 2008a) qui vont entraîner une vasodilatation. Les astrocytes peuvent aussi libérer l'acide arachidonique produit qui va être converti par les cytochromes P450 ω -hydroxylases des cellules muscles lisses en un acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) vasoconstricteur, le 20-HETE (Gebremedhin et al., 2000; Mulligan and MacVicar, 2004; Metea and Newman, 2006).

Ce contrôle bidirectionnel par les astrocytes pourrait être expliqué par le tonus vasculaire lors de l'activation astrocytaire qui va favoriser les vasodilatations ou les vasoconstrictions (Blanco

et al., 2008) mais aussi par une régulation selon la concentration de NO (Zonta et al., 2003; Mulligan and MacVicar, 2004; Metea and Newman, 2006) Ainsi, en fonction de l'activité neuronale, de faibles concentrations va plutôt favoriser les vasodilatations alors qu'à plus forte concentration, il favorise les vasoconstrictions (Duchemin et al., 2012).

Les données récentes de la littérature tendent à montrer que les astrocytes contrôleraient plutôt la perfusion sanguine au niveau capillaire alors que les neurones la réguleraient au niveau artériolaire (Peppiatt et al., 2006; Hamilton, 2010; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2016).

Le rôle de l'endothélium

L'endothélium va agir comme un senseur de l'activité neuronale dans le couplage neurovasculaire. Lors d'une stimulation de vibrisses de rat activant les neurones en couche IV du cortex somesthésique, une vasodilatation des artères piales irriguant le site d'activation a été observée (Ngai et al., 1988; Cox et al., 1993). Une propagation rétrograde de la vasodilatation passant par l'endothélium a été proposée (Dietrich et al., 1996). Ce phénomène peut être expliqué par une hyperpolarisation rétropropagée par les canaux $K_{ir}2.1$ des cellules endothéliales (Longden and Nelson, 2015; Longden et al., 2017) et conduite au travers de l'endothélium par des connexines (Figuroa and Duling, 2009) jusqu'au niveau des artéioles. Cette hyperpolarisation est ensuite transmise aux cellules musculaires lisses par des jonctions communicantes avec les cellules endothéliales (Figuroa and Duling, 2009; Hannah et al., 2011) qui vont se relaxer et induire la vasodilatation des artéioles (Iadecola, 2004; Girouard and Iadecola, 2006).

Des données récentes semblent indiquer que le NO endothélial participerait aussi au couplage neurovasculaire (Stobart et al., 2013; Chow et al., 2020). Les cellules endothéliales du SNC sont aussi très riches en cavéoles permettant un transport par transcytose. Leur suppression dans des souris transgéniques diminue la réponse hyperémique à l'activité neuronale (Chow et al., 2020) suggérant un rôle important de ces cavéoles endothéliales. La position luminale des cellules endothéliales rend surprenant un tel rôle mais pourrait être complémentaire de la vasodilatation rétrograde. Les cellules endothéliales peuvent aussi potentialiser la réponse hyperémique par l'action de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sur leurs récepteurs NMDA luminaux des cellules endothéliales lorsqu'il est présent dans la circulation sanguine (Anfray et al., 2020).

La corrélation entre l'activité cérébrale et la perfusion sanguine

Il est important de mentionner que le couplage neurovasculaire va être influencé par le niveau d'activation cérébrale. Pour l'illustrer, un bon exemple est la modification de la perfusion sanguine dans le réseau du « mode par défaut » lors de la transition entre un état de repos et un état actif (Raichle et al., 2001; Lu et al., 2012; Raichle, 2015; Whitesell et al., 2021). Au repos et les yeux fermés, des aires des lobes pariétal, frontal et temporal vont s'activer ensemble et toutes présenter une augmentation du signal BOLD. Ces aires cérébrales concernées vont présenter une désactivation fonctionnelle (Zhang and Raichle, 2010) lors d'une tâche cognitive ou attentionnelle caractérisée par une diminution de leur activité neuronale et un signal BOLD négatif persistant (Shmuel et al., 2002, 2006; Devor et al., 2007; Boorman et al., 2010). Les réponses hémodynamiques sont par ailleurs particulièrement corrélées avec les oscillations dans la bande gamma (25-140 Hz) de l'activité cérébrale induites lors de ces tâches cognitives et attentionnelles (Niessing et al., 2005; Bergel et al., 2018). Ces corrélations entre la réponse hyperémique et l'activité neuronale soulignent l'influence du régime d'activité neuronale sur la réponse vasculaire.

- **Le couplage neurovasculaire** est l'étroite relation entre l'activité neuronale et la perfusion sanguine cérébrale.
- Une augmentation de l'activité neuronale va induire une augmentation de la perfusion sanguine cérébrale nommée **hyperémie fonctionnelle**, soutenue par des **vasodilations**. Elle est temporellement et spatialement restreinte par des **vasoconstrictions** terminant la réponse hyperémique et prédominantes autour de la zone activée.
- L'**hypothèse rétrograde** du couplage neurovasculaire s'appuie sur une régulation de la perfusion sanguine en réponse à la demande énergétique par **des métabolites** produits lors de l'activité neuronale.
- Dans l'**hypothèse antérograde** du couplage neurovasculaire, les neurones, les astrocytes et/ou les cellules endothéliales vont contrôler directement la perfusion sanguine par la production et libération de **messagers vasoactifs**.

Problématique

Le néocortex est le siège des processus sensoriels, moteurs et cognitifs élaborés tels que la conscience, le langage ou encore la pensée abstraite. Il est composé de neurones excitateurs et inhibiteurs et de cellules gliales comme les astrocytes. Le fonctionnement du néocortex est dépendant d'un apport sanguin en oxygène et en glucose constant qui est assuré par un dense réseau vasculaire irrigué par les artères piales. Ce réseau intracortical est constitué d'artérioles, de capillaires et de veinules. La perfusion sanguine augmente localement lors d'une augmentation de l'activité neuronale. Ce lien étroit entre l'activité neuronale et le flux sanguin cérébral est appelé couplage neurovasculaire et est essentiel au bon fonctionnement et à l'intégrité du cerveau (Iadecola, 2004).

Ce couplage est par ailleurs la base physiologique des signaux visualisés par certaines techniques d'imagerie cérébrale fonctionnelle, utilisées en clinique à des fins de diagnostic et qui sont devenues fondamentales dans la recherche en neurosciences cognitives. Ces techniques permettent de cartographier l'activité neuronale en suivant les changements hémodynamiques. Pourtant, les mécanismes du couplage neurovasculaire demeurent encore mal compris. Il est donc nécessaire de mieux les connaître afin de mieux interpréter l'imagerie cérébrale fonctionnelle.

On sait que ce couplage fait intervenir les neurones, les astrocytes, les cellules murales et les cellules endothéliales. Une activité neuronale permet le recrutement des cellules murales contractiles par la libération de messagers vasoactifs qui vont agir sur le calibre des vaisseaux sanguins intracorticaux. Ainsi, cette activation neuronale permet une vasodilatation des artérioles pénétrantes et une augmentation de la perfusion sanguine cérébrale localement appelée hyperémie fonctionnelle. La nature et la durée du stimulus présenté semblent avoir une influence sur le type cellulaire et les messagers vasoactifs qui vont être impliqués (Buerk et al., 2003; Cauli and Hamel, 2010). De plus, l'état d'activité cérébrale va aussi influencer la réponse vasculaire sur une large gamme de fréquences (Niessing et al., 2005; Zhang and Raichle, 2010; Ma et al., 2016; Bergel et al., 2018). Mais les mécanismes exacts de recrutement de chacun des acteurs cellulaires et moléculaires restent encore mal compris.

Parmi ces acteurs cellulaires, les neurones pyramidaux, les neurones principaux du néocortex, vont grandement participer au couplage neurovasculaire de par leur transmission glutamatergique qui permet à ces neurones d'activer et de recruter des types cellulaires vasomoteurs, mais également par leur potentiel vasoactif intrinsèque. En effet, les neurones

pyramidaux exprimant la COX-2 sont responsables d'environ la moitié de la réponse dilatatoire par la libération de la PGE2 (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). Étonnamment, la PGE2 peut bien induire des vasodilatations à de faibles concentrations, mais aussi des vasoconstrictions à plus fortes concentrations (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). Ceci suggère un rôle plus complexe des neurones pyramidaux dans le couplage neurovasculaire. Ce couplage pourrait ainsi être dépendant du niveau d'activité des neurones pyramidaux et de la subséquente production de PGE2.

Ainsi, l'objectif principal de mon étude de thèse est de déterminer si selon le régime d'activité, les neurones pyramidaux peuvent déclencher des réponses neurovasculaires vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et d'en préciser les mécanismes sous-jacents.

Présentation des articles

Bidirectional control of the neurovascular coupling by pyramidal neurons

Benjamin Le Gac, Sandrine Picaud, Dongdong Li & Bruno Cauli

Article en préparation

Afin de répondre à notre problématique, nous avons réalisé l'ensemble de l'étude *ex vivo*, sur des tranches corticales de souris. Les neurones et les vaisseaux sanguins sont visualisés par vidéomicroscopie infrarouge (780 nm) avec un gradient de contraste de Dodt (Dodt et al., 2002). Celle-ci offre la possibilité d'enregistrer l'activité neuronale par une approche électrophysiologique, d'observer les dynamiques vasculaires et calciques et est particulièrement adaptée aux analyses pharmacologiques. Par ailleurs, les photons de 780 nm de longueur d'onde n'activent pas la channelrhodopsine-2 (ChR2) (Lin et al., 2009).

Il était nécessaire d'activer spécifiquement les neurones pyramidaux tout en ayant une possibilité de moduler leur niveau d'activation. Nous avons donc utilisé la lignée de souris transgéniques *Emx1-cre;Ai32* (Gorski et al., 2002; Madisen et al., 2012) permettant l'expression conditionnelle de la ChR2 sélectivement dans les neurones pyramidaux et leur activation par de la lumière à 470 nm. Ainsi, nous avons réalisé des photostimulations grâce à des diodes électroluminescentes (« light-emitting diode » ou LED) à 470 nm reliées au port d'épifluorescence du microscope (Figure 29). Les photostimulations consistent en des trains de 10 secondes, d'impulsions lumineuses de 5 millisecondes, d'une intensité d'environ 10 mW/mm² et délivrées à cinq fréquences différentes (1, 2, 5, 10 et 20 Hz).

Nous avons vérifié au préalable, par des enregistrements de patch-clamp, que les neurones pyramidaux des couches II/III étaient bien activés aux différentes fréquences de photostimulation. Nous avons ensuite visualisé les réponses vasculaires des artérioles pénétrantes en couche I induites par ces mêmes photostimulations. Nous avons ainsi montré que la stimulation optogénétique des neurones pyramidaux à 2 Hz induit des vasodilatations tandis qu'à 20 Hz elle entraîne des vasoconstrictions. Ces photostimulations induisent une augmentation de calcium intracellulaire, un prérequis à la synthèse et/ou la libération de messagers vasoactifs (Lauritzen, 2005; Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010) d'autant plus importante que les fréquences sont élevées.

Ces données confirment les propriétés vasodilatatrices des neurones pyramidaux observées précédemment (Lacroix et al., 2015), mais révèlent aussi des propriétés vasoconstrictrices dont les mécanismes n'ont pas été étudiés.

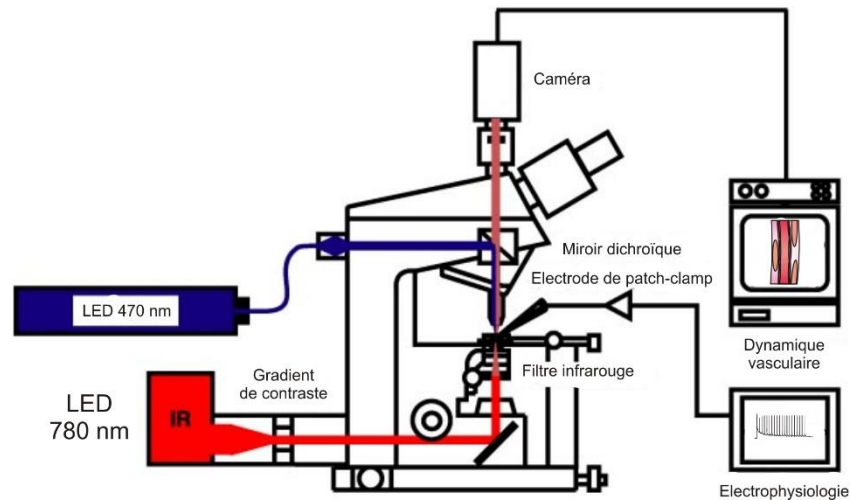


Figure 29 : Représentation du poste d'imagerie et d'électrophysiologie utilisé durant le doctorat. *Adaptée de Dodt et al., 2002.*

Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces vasoconstrictions. Des prostaglandines vasoconstrictrices comme la PGE2 à forte concentration (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020) ou la prostaglandine F2 α (PGF2 α) (Vysniauskiene et al., 2006) sont produites à partir de l'acide arachidonique et peuvent nécessiter l'activité de la COX-2 neuronale (Takei et al., 2012; Lacroix et al., 2015). Nous avons donc déterminé le profil d'expression des enzymes de la voie de biosynthèse de ces prostaglandines dans les neurones pyramidaux par RT-PCR sur cellule unique. Les aspects techniques de cette méthode sont plus amplement abordés dans le deuxième article « Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp ». Cette analyse montre que les neurones pyramidaux à COX-2 représentent environ un tiers des neurones pyramidaux et qu'ils expriment les ARNm des enzymes nécessaires à la synthèse de la PGE2 et de la PGF2 α .

A l'instar des vasodilatations induites par les neurones pyramidaux, l'analyse pharmacologique des vasoconstrictions évoquées a montré, qu'elles sont dépendantes de l'activité neuronale et de la COX-2, constitutivement exprimée par les neurones pyramidaux (Yamagata et al., 1993; Kaufmann et al., 1996; Wang et al., 2005). Par ailleurs, elles ne

nécessitent, ni une transmission glutamatergique, ni l'activité de la COX-1. Nous avons donc ciblé par la suite notre analyse pharmacologique sur les récepteurs vasoconstricteurs de la PGE2 et de la PGF2 α . Nous avons ainsi montré que ces vasoconstrictions mettent en jeu les récepteurs EP1 et EP3 vasoconstricteurs de la PGE2 mais apparemment pas le récepteur FP de la PGF2 α .

Nous avons évalué les propriétés vasoactives de la PGE2 dans notre modèle de tranches corticales de souris par des applications exogènes à différentes concentrations. Nous avons observé qu'en conditions basales, c'est-à-dire sans précontraction des artérioles, la PGE2 à des concentrations inférieures ou égales à 100 nM est capable d'induire de faibles et rares vasodilatations. Nous avons également confirmé que la PGE2 induisait des vasoconstrictions dépendantes de la concentration à des concentrations égales ou supérieures à 100 nM (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020).

Bien que la transmission glutamatergique ne semble pas impliquée dans les réponses vasoconstrictrices, les neurones pyramidaux sont susceptibles de recruter des astrocytes ou des neurones par l'intermédiaire de la PGE2 (Di Cesare et al., 2006; Clasadonte et al., 2011). Nous avons donc ciblé pharmacologiquement les voies vasoconstrictrices du 20-HETE (Gebremedhin et al., 2000; Mulligan and MacVicar, 2004; Metea and Newman, 2006) et du K⁺ astrocytaire (Girouard et al., 2010) mais aussi la voie du NPY produit par des interneurones GABAergiques (Tuor et al., 1990; Abounader et al., 1995; Cauli et al., 2004; Uhlirova et al., 2016). Cette analyse montre que les astrocytes ne semblent pas être mis en jeu dans cette réponse mais que le NPY est essentiel à l'expression de la réponse vasoconstrictrice induite par les neurones pyramidaux.

L'ensemble de mes résultats suggère donc que suivant leur niveau d'activité les neurones pyramidaux induisent une réponse neurovasculaire bidirectionnelle, vasodilatatrice ou vasoconstrictrice en libérant la PGE2. De plus, ces vasoconstrictions sont induites par la combinaison d'une action directe des neurones pyramidaux par la production et la libération de PGE2 agissant sur les récepteurs vasculaires EP1 et EP3 mais aussi par la production et la libération de NPY par des interneurones GABAergiques.

Results

Pyramidal neurons switch NVC polarity in an activity-dependent manner

Hemodynamics is tightly correlated with neuronal activity over a wide range of brain rhythmic oscillations (Niessing et al., 2005; Ma et al., 2016; Bergel et al., 2018) which largely reflect the synchronous activity of pyramidal neurons (Logothetis, 2008). However, the functional correlation between the activity regimes of pyramidal neurons and NVC response remains elusive. To address this question, we selectively controlled their spiking activity and monitored the evoked NVC response using the transgenic mice *Emx1-cre;Ai32* expressing the H134R variant of channelrhodopsin-2 (ChR2) in pyramidal neurons (Gorski et al., 2002; Madisen et al., 2012). Pyramidal neurons at layer II-III were photostimulated in cortical slices by 10s trains of 5 ms light pulses (see Methods) delivered at five different frequencies (1, 2, 5, 10 and 20 Hz, Fig. 1a, lower panels).

To assess the efficiency of this photostimulation paradigm, the voltage response of pyramidal neurons was monitored by whole-cell current clamp recordings (Fig. 1a). Pyramidal neurons firing is characterized by an initial action potential followed by a train of spikes whose amplitude and frequency underwent a transient decrease then rebounded to a steady-state level (Fig. 1a, upper panels). The transient decrease in frequency was more pronounced with increasing photostimulation frequencies up to 10 Hz (Fig. 1a, middle panels; $n = 4$ cells, minimal success rate = $95 \pm 5.1\%$ at 1 Hz, $90 \pm 7.1\%$ at 2 Hz, $20 \pm 9.4\%$ at 5 Hz, $5 \pm 5.1\%$ at 10 Hz and $50 \pm 11.8\%$ at 20 Hz). Consistent with the kinetic properties of the H134R ChR2 variant (Lin, 2011), the steady-state firing frequency matched the photostimulation frequency up to 5 Hz. but was lower at higher frequencies (Fig. 1a, middle panels, steady-state success rate; $100 \pm 0\%$ at 1, 2 and 5 Hz, $70 \pm 10.8\%$ at 10 Hz and $55 \pm 11.7\%$ at 20 Hz). These observations indicate that pyramidal neurons can be efficiently activated over a wide range of photostimulation frequencies.

The optogenetic neurovascular response of diving arterioles was next visualized in layer I (Fig. 1b,c; Supp. table 1) by infrared videomicroscopy at 780 nm which does not activate ChR2 (Lin et al., 2009). Photostimulation of pyramidal neurons at 1 Hz did not elicit any reliable changes in vascular diameter (Fig. 1c-e; $\Delta D/D_0 = -0.1 \pm 4.1\%$, magnitude = $15.6 \pm 17.4\% \cdot \text{min}$, $n = 4$ arterioles). At 2 Hz, it evoked a slight and delayed vasodilation (Fig. 1c,d; $\Delta D/D_0 = 1.6 \pm 4.9\%$,

n = 10 arterioles) lasting several minutes (Fig. 1c,e; magnitude = 41.7 ± 48.2 %·min). Similarly to the 1 Hz optogenetic stimulation, 5 Hz photostimulation did not elicit consistent vascular responses (Fig. 1c-e; $\Delta D/D_0 = -2.0 \pm 5.7$ %, magnitude = 26.4 ± 69.2 %·min, n = 6 arterioles). Surprisingly, when photostimulated at 10 Hz pyramidal neurons induced consistent vasoconstrictions (Fig. 1c-e; $\Delta D/D_0 = -5.9 \pm 4.6$ %, magnitude = -81.6 ± 44.5 %·min, n = 5 arterioles) that were even more pronounced when stimulated at 20 Hz, (Fig. 1c-e; $\Delta D/D_0 = -15.6 \pm 1.8$ %, magnitude = -150.2 ± 38.8 %·min, n = 12 arterioles). This frequency-dependent inversion of the polarity of the neurovascular response was confirmed between 2 Hz and 20 Hz on both their amplitude (Fig. 1c,d; $H_{(4,37)} = 14.16$, $p = 6.787 \times 10^{-3}$, Kruskal-Wallis test; $U_{(10,12)} = 13$, $p = 1.083 \times 10^{-3}$, Mann-Whitney *U* test) and magnitude (Fig. 1c,d; $H_{(4,37)} = 13.01$, $p = 0.0112$; $U_{(10,12)} = 16$, $p = 2.536 \times 10^{-3}$). ChR2-independent vascular responses induced by high light intensity have been reported which might lead to potential confounding effects (Choi et al., 2010; Rungta et al., 2017). This possibility, however, was ruled out by the observation that the 20 Hz photostimulation did not induce neurovascular responses in cortical slices from wild-type mice that do not express ChR2 (Supplementary Fig.1).

To determine whether spiking activity was required for vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation, we next blocked action potentials with tetrodotoxin (TTX, 1 μ M, n = 10 arterioles). TTX completely abolished the vascular response (Fig. 1f-h; $\Delta D/D_0 = -0.14 \pm 3$ %, $U_{(12,10)} = 6.5$, $p = 9.897 \times 10^{-5}$; magnitude = 13.5 ± 23.2 %·min, $U_{(12,10)} = 18$, $p = 4.271 \times 10^{-3}$) indicating that vasoconstriction induced by optogenetic stimulation of pyramidal neurons requires action potentials. Other cell types, including neuropeptide Y (NPY) interneurons and astrocytes, have been shown to induce also vasoconstriction when their activity is increased (Cauli et al., 2004; Girouard et al., 2010; Uhlirva et al., 2016), which could be recruited by increased glutamate release from pyramidal neurons photostimulated at 20 Hz. To test this hypothesis, we next blocked glutamatergic transmission by antagonizing the ionotropic AMPA/kainate and NMDA receptors as well as the group I metabotropic receptors mGluR1 and mGluR5 which are likely to recruit both interneurons and astrocytes (Cauli et al., 2000; Zonta et al., 2003; Wang et al., 2006; Girouard et al., 2010). Blockade of glutamate receptors did not alter either the amplitude (n = 10 arterioles, -12.0 ± 1.7 %, $U_{(12,10)} = 42$, $p = 0.2543$) or the magnitude (-95.71 ± 17.2 %·min, $U_{(12,10)} = 52$, $p = 0.6277$) of vasoconstriction (Fig. 1g,h),

indicating that glutamatergic transmission is not involved in the neurovascular response to 20 Hz photostimulation of pyramidal neurons.

Collectively, our data confirmed the vasodilatory properties of pyramidal neurons (Lecrux et al., 2011; Scott and Murphy, 2012; Lacroix et al., 2015; Uhlirova et al., 2016) and disclosed their ability to induce, when stimulated at high frequency, vasoconstriction that requires action potentials but not glutamatergic transmission. We then explored the nature of the messengers mediating these bimodal neurovascular responses.

Optogenetic stimulations trigger a frequency-dependent gradual intracellular calcium increase preceding the neurovascular responses

If these neurovascular responses are mediated by vasoactive substances produced by pyramidal cells, it is expected that an intracellular calcium increase, a prerequisite for the synthesis and/or release of these messengers (Lauritzen, 2005; Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010), would precede the vascular responses. To determine whether 2 Hz and 20 Hz photostimulations efficiently induced intracellular calcium increase in pyramidal cells, we combined optogenetic stimulation with whole-cell current clamp recording and calcium imaging with Rhod-2 delivered through the patch pipette (Fig 2a). As expected from the action spectrum of ChR2 (Lin et al., 2009), excitation of this red calcium dye at 585 nm did not induce any voltage responses in the recorded pyramidal cells (Fig. 2a and supplementary Fig. 2). By contrast, photostimulation at 470 nm triggered a train of spikes immediately followed by an intracellular calcium increase without triggering any noticeable recurrent network activity triggering spikes (Supplementary Fig. 2). The calcium increase was higher at 20 Hz than 2 Hz (Fig. 2b; $\Delta F/F_0 = 34.5 \pm 3.7\%$, $n = 9$ cells, vs. $\Delta F/F_0 = 79.5 \pm 17.7\%$, $n = 9$ cells; $U_{(9,9)} = 17$, $p = 0.03998$) and preceded the initial phase of the vascular responses (Fig. 1e and 2a). These results show a frequency-dependent intracellular calcium increase induced by photostimulation, which is temporally compatible with the synthesis and/or release of vasoactive messengers by pyramidal cells and subsequent vascular response.

Pyramidal cells express the enzymes required for PGE2 and PGF2 α synthesis

Pyramidal neurons have been shown to induce vasodilations through the release of arachidonic acid metabolites derived from the activation of the cyclooxygenase-2 (COX-2) (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). Several COX-2 metabolites,

including prostaglandins E2 (PGE2) and F2 α (PGF2 α), exert dose-dependent vasoconstriction (Vysniauskiene et al., 2006; Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020), suggesting that their production and release would be increased with photostimulation frequency so as to promote vasoconstriction.

To test this hypothesis, we next probed the expression of PGE2 and PGF2 α synthesizing enzymes in layer II-III pyramidal neurons by single-cell RT-PCR whose sensitivity was validated from 500 pg of total forebrain RNAs (Supplementary Fig. 3). Sixteen layer II-III pyramidal neurons were visually identified by the pyramidal shape of their soma. Their glutamatergic phenotype was confirmed by their typical regular spiking pattern (Fig. 3a) and by the expression the vesicular glutamate transporter, vGlut1, but none of the two GABA synthesizing enzymes (GADs, Fig. 3b) (Karagiannis et al., 2009).

The rate limiting enzymes, COX-1 and COX-2, were respectively detected in 25% (n = 4 out of 16 cells) and 31 % (n = 5 out of 16 cells) of pyramidal neurons (Fig. 3b-d) but were never found co-expressed (Fig. 3d). A large majority of pyramidal neurons expressed the PGE2 terminal synthesizing enzyme cPGES (Fig. 3b-d; 88 %, n = 14 out of 16 cells). In addition, mPGES1 and mPGES2 were respectively in 6 % (Fig. 3b, n = 1 out of 16 cells) and 38% (Fig. 3b,c; n = 6 out of 16 cells) of pyramidal neurons and always co-expressed with cPGES. Similarly, a majority of neurons expressed the PGF2 α terminal synthesizing enzyme AKR1B3 (Fig. 3b-d; n = 11 out of 16 cells, 69 %) which was occasionally co-expressed with PM-PGFS (Fig. 3c, n = 5 out of 16 cells, 31 %) and the PGE2-to-PGF2 α converting enzyme CBR1 (Fig. 3c; n = 3 out of 16 cells, 19 %). CBR1 was also always co-expressed with at least one PGES.

COX-1 positive pyramidal neurons co-expressed a PGES (Fig. 3d) and a majority a PGFS (n = 3 out of 4). Similarly, all COX-2 positive neurons co-express both a PGES and a PGFS (Fig. 3d). Consistently with RNAseq data (Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016), our results indicate that subpopulations of pyramidal neurons expressed all the enzymes required for PGE2 and PGF2 α synthesis.

PGE2 derived from COX-2 causes neurogenic vasoconstriction by acting primarily on EP1 receptor

To determine whether PGE2 and/or PGF2 α could mediate vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation of pyramidal neurons, we next inhibited their synthesis. Pretreatment with

different COX inhibitors did not alter the diameter of penetrating arterioles indicating that tonic prostaglandins do not influence basal vascular tone (Supplementary Fig. 4). By contrast, the neurovascular response was completely abolished by the non-selective COX-inhibitor, indomethacin (5 μ M, supplementary Table 3, Fig. 4a-c; $n=10$ arterioles, $\Delta D/D_0 = -0.3 \pm 1.8 \%$, $U_{(12,10)} = 2$, $p = 1.237 \times 10^{-5}$; magnitude = $3.1 \pm 12.6 \%.min$, $U_{(12,10)} = 8$, $p = 1.8867 \times 10^{-4}$), indicating that prostaglandins indeed mediate the vasoconstrictions. To evaluate whether they derived from the COX-1 or the COX-2 pathway, we used selective inhibitors. The COX-1 inhibitor SC-560 (100 nM, $n = 10$ arterioles, supplementary Table 3) did not alter the amplitude ($-9.6 \pm 2.6 \%$, $U_{(12,10)} = 33$, $p = 0.0804$) nor the magnitude ($-75.6 \pm 29.6 \%.min$, $U_{(12,10)} = 38$, $p = 0.1593$) of the vasoconstrictions (Fig. 4a-c). By contrast, the COX-2 inhibitor, NS-398 (10 μ M, $n = 10$ arterioles, supplementary Table 3) completely abolished the vasoconstrictions induced by pyramidal neurons (Fig. 4a-c; $\Delta D/D_0 = -2.1 \pm 1.6 \%$, $U_{(12,10)} = 1$, $p = 6.186 \times 10^{-6}$; magnitude = $-3.13 \pm 10.2 \%.min$, $U_{(12,10)} = 12$, $p = 7.949 \times 10^{-4}$). Together these observations revealed that prostaglandins derived from COX-2 activity mediate pyramidal neurons-induced vasoconstriction.

To determine the nature of prostaglandins and the receptors involved, we next selectively antagonized the vasoconstrictive receptors of PGE₂, EP1 or EP3, or the FP receptor of PGF₂ α . EP1 or EP3 antagonism did not alter the diameter of diving arterioles indicating that tonic PGE₂ does not influence their basal vascular tone. The selective antagonism of PGE₂ EP1 receptor by ONO-8130 (10 nM, $n = 10$ arterioles, supplementary Table 3) strongly reduced both the maximal amplitude ($-3.7 \pm 2.8 \%$, $U_{(12,10)} = 18$, $p = 4.080 \times 10^{-3}$) and the magnitude ($-16.6 \pm 13.4 \%.min$, $U_{(12,10)} = 14$, $p = 1.398 \times 10^{-3}$) of the neurovascular responses (Fig. 4d-f). Blockade of EP3 receptor by L-798,106 (1 μ M, $n = 10$ arterioles, Fig. 4d-f, supplementary Table 3) did not alter the amplitude ($-8.8 \pm 1.9 \%$, $U_{(12,10)} = 26$, $p = 0.0243$) and the magnitude ($-42.4 \pm 24.1 \%.min$, $U_{(12,10)} = 25$, $p = 0.0200$) of the overall neurovascular response. However, blockade of EP3 receptor reduced the initial phase of the response ($\Delta D/D_0 = -2.2 \pm 1.6 \%$, $U_{(12,10)} = 18$, $p = 0.0034$; magnitude = $-5.2 \pm 3 \%.min$, $U_{(12,10)} = 19$, $p=0.0043$). Application of the FP antagonist slightly constricted arterioles (supplementary Fig. 4; luminal diameter before application $21.8 \pm 2.5 \mu$ m and during $20.9 \pm 2.6 \mu$ m, $n = 9$ arterioles, $t_{(8)} = 2.374$, $p = 0.0449$, paired t-test). Such a vasoconstriction is likely due to the fact that AL-8810 is also a weak partial agonist (Sharif and Klimko, 2019) making difficult to determine the basal influence of

PGF2 α on vessel diameter. Antagonism of PGF2 α FP receptor with AL-8810 (10 μ M, n = 10 arterioles, Fig. 4d-f, Supplementary table 3) did not modify evoked vasoconstriction ($\Delta D/D_0 = -11.5 \pm 2.0$ %, $U_{(12,9)} = 34$, $p = 0.1694$; magnitude = -88.9 ± 21.8 %.min, $U_{(12,9)} = 44$, $p = 0.5079$). Our results suggest that pyramidal neurons induced vasoconstriction via the release of PGE2 derived from COX-2 and acting primarily on EP1 receptor and, to a lesser extent, on EP3 receptor for the initial phase of the response.

PGE2 can induce dose-dependently both vasoconstriction and vasodilation

To evaluate whether PGE2 could indeed mediate the neurovascular responses induced by the optogenetic stimulation of pyramidal neurons, we exogenously applied it at different concentrations (10 nM, 100 nM, 1 μ M and 10 μ M) and visualized the vascular responses. Overall, PGE2 induced dose-dependent vasoconstriction (Fig. 5a-c) which was maximal at 10 μ M ($\Delta D/D_0 = -22.1 \pm 5.1$ %, magnitude = -323.3 ± 106.8 %.min, n = 6 arterioles). Nonetheless, below 10 μ M it also evoked occasional vasodilations in 3 out of 7 arterioles at 10 nM, in 2 out of 8 arterioles at 100 nM and in 2 out of 7 arterioles at 1 μ M. Both their amplitude (4.1 ± 1.0 % at 10 nM, 9.9 ± 2.3 % at 100 nM, and 4.2 ± 1.3 % at 1 μ M) and magnitude (Fig. 5 b,c, 20.3 ± 1.7 %.min at 10 nM, 98.0 ± 69.3 %.min at 100 nM and 22.3 ± 4.2 %.min at 1 μ M) seemed to follow a bell-shaped curve with a maximum at 100 nM. These observations indicate that PGE2 can induce dose-dependently both vasoconstriction and vasodilation to a lesser extent.

NPY initiates vasoconstriction induced by pyramidal neurons

Whether PGE2 directly signals on its receptors in smooth muscle cells or indirectly by the recruitment neurons or/and astrocytes has been recently questioned (Kaplan et al., 2020). Indeed, its receptors are expressed by both astrocytes and neurons (Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016) and PGE2 has been shown to activate some astrocytes and neurons (Bezzi et al., 1998; Di Cesare et al., 2006; Clasadonte et al., 2011). To evaluate whether astrocytes could mediate the PGE2-dependent vasoconstriction evoked by pyramidal neurons, we targeted the BK channels (Girouard et al., 2010) and 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) (Mulligan and MacVicar, 2004) pathways in astrocytes, both being implicated in regulating neurovascular tone. Blockade of BK channels with paxilline (1 μ M, n = 10 arterioles, Supplementary table 3) did not alter the neurovascular response (Fig. 6a-c; $\Delta D/D_0 = -12.8 \pm 4.0$ %, $U_{(12,10)} = 57$, $p = 0.8718$; magnitude = -95.8 ± 22.9 %.min, $U_{(12,10)} = 52$, $p = 0.6277$). Similarly, selective inhibition of the 20-HETE synthesizing enzyme, CYP450 ω -hydroxylase, with

HET-0016 (100 nM, n = 10 arterioles, Supplementary table 3) did not modify the neurovascular response either (Fig. 6a-c; $\Delta D/D_0 = -9.9 \pm 2.3 \%$, $U_{(12,10)} = 30$, $p = 0.0490$; magnitude = $-78.7 \pm 28.5 \%.min$, $U_{(12,10)} = 40$, $p = 0.1975$). These data indicate that astrocytes do not mediate the vasoconstriction induced by pyramidal cells. We next sought to determine if NPY, a potent vasoconstrictor (Abounader et al., 1995; Cauli et al., 2004), was involved in this neurovascular response. Antagonism of the NPY Y1 receptors by BIBP3226 (1 μ M, n = 10 arterioles, Supplementary table 3) reduced the maximal vasoconstriction amplitude (Fig. 6b; $-6.8 \pm 2.3 \%$, $U_{(12,10)} = 19$, $p = 5.516 \times 10^{-3}$) but did not alter the overall magnitude response (Fig. 6c; $-39.7 \pm 16.1 \%.min$, $U_{(12,10)} = 26$, $p = 0.0242$). BIBP3226 completely abolished the initial phase of neurovascular response occurring during the first five minutes following photostimulation (Fig. 6a; $\Delta D/D_0 = 0 \%$, $U_{(12,10)} = 10$, $p = 1.778 \times 10^{-4}$; magnitude = $0 \%.min$, $U_{(12,10)} = 10$, $p = 1.778 \times 10^{-4}$). These results indicate that neurogenic vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation of pyramidal neurons do not involve astrocytic pathways but they suggest that it is initiated by NPY-expressing interneurons (Karagiannis et al., 2009).

Methods

Animal models

Transgenic homozygous mice $Emx1^{cre}$ [Jackson Laboratory, stock #005628, B6.129S2- $Emx1^{tm1(cre)Krl/J}$ (Gorski et al., 2002)] were crossed with homozygous mice Ai32 [Jackson Laboratory, stock #012569, B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J} (Madisen et al., 2012)] to obtain heterozygous $Emx1^{cre/WT};Ai32^{ChR2/WT}$ mice for optogenetic experiments. C57BL/6RJ mice were used for PGE2 exogenous applications, control optogenetic experiments and single-cell RT-PCR experiments. 16-21 postnatal days old females and males were used for all *ex-vivo* experiments. All experimental procedures using animals were carried out in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE).

Ex vivo slice preparation

Mice were deeply anesthetized by isoflurane (IsoVet, Piramal Healthcare UK or IsoFlo, Axience) evaporation in a closed box then euthanized by decapitation. The brain was quickly removed and placed in cold ($\sim 4^\circ C$), oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing

(in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 15 sucrose and 1 kynurenic acid (Sigma-Aldrich). 300 µm-thick coronal slices containing "barrel" cortex were cut with a vibratome (VT1000s; Leica) and were allowed to recover at room temperature for at least 45 min with oxygenated aCSF (95% O₂/5% CO₂) (Devienne et al., 2018). The slices were then transferred to a submerged recording chamber and continuously perfused at a rate of 2 ml/min with oxygenated aCSF lacking kynurenic acid.

Whole-cell recordings

Patch pipettes (5.5 ± 0.2 M Ω) pulled from borosilicate glass were filled with 8 µl of RNase free internal solution containing the following (in mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm). For electrophysiological recordings combined with calcium imaging, EGTA was replaced by 200 µM Rhod-2 (20777, Cayman chemicals). Whole-cell recordings were performed at room temperature (20-25 °C) using a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, MDS). Data were filtered at 5-10 kHz and digitized at 50 kHz using an acquisition board (Digidata 1440, MDS) attached to a personal computer running pCLAMP 10.2 software package (MDS). Electrophysiological properties were determined in current-clamp mode (Karagiannis et al., 2009). Membrane potential values were corrected for theoretical liquid junction potential (-15.4 mV). Resting membrane potential of neurons was measured just after passing in whole-cell configuration. Only neurons with a resting membrane potential more hyperpolarized than -60 mV were analyzed further.

Optogenetic stimulation

Optogenetic stimulation was achieved through the objective using a 470 nm light emitting device (LED, CoolLED, Precise Excite) attached to the epifluorescent port of a BX51WI microscope (Olympus) and a set of multiband filters composed of an excitation filter (HC 392/474/554/635, Semrock), a dichroic mirror (BS 409/493/573/652, Semrock) and an emission filter (HC 432/515/595/730, Semrock). Photostimulation consisted in a 10 s train of 5 ms light pulse at an intensity of 10 mW/mm² and delivered at five different frequencies (1, 2, 5, 10 and 20 Hz).

Infrared imaging

Blood vessels and cells were observed in slices under infrared (IR) illumination using a double-port upright microscope (BX51WI, Olympus) equipped with Dodt gradient contrast optics

(DGC; Luigs and Neumann; [\(Dodt and Zieglgänsberger, 1998\)](#)) and a collimated light emission device (LED; 780 nm; ThorLabs) as a source of transmitted light, a 40X (LUMPlanF/IR, 40X/0.80 W, Olympus) or a 60X (LUMPlan FL/IR 60X/0.90 W, Olympus) objective and a digital camera (OrcaFlash 4.0, Hamamatsu) attached on the front port of the microscope. Diving arterioles in layer I were selected under IR-DGC videomicroscopy on the basis of their well-defined luminal diameter (8-40 μm), their length remaining in the focal plane for at least 50 μm ([Cauli et al., 2004](#); [Rancillac et al., 2006](#); [Lacroix et al., 2015](#)), the thickness of their wall ($4.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $n = 174$ blood vessels). A resting period of at least 30 min ([\(Lovick and Stezhka, 1999; Zonta et al., 2003\)](#)) was observed after slice transfer. Following photo-induced responses, contractibility of arterioles was verified by the application of aCSF containing the thromboxane A2 agonist, U46619 (100 nM) or enriched in K^+ (composition in mM: 77.5 NaCl, 50 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 glucose, 15 sucrose ([Sagher et al., 1993](#))). Blood vessels that did not constrict to these applications were discarded. Only one arteriole was monitored per slice. Infrared images were acquired at 0.1 Hz during pharmacological applications and at 1 Hz for optogenetic experiments using Imaging Workbench 6.1 software (Indec Byosystems). The focal plane was constantly maintained on-line using infrared DGC images of cells as anatomical landmarks ([Lacroix et al., 2015](#)).

Calcium imaging

Visually and electrophysiologically identified layer II-III pyramidal neurons were filled via the patch pipettes with the calcium-sensitive dye Rhod-2 (200 μM , Cayman chemicals, 20777). Recordings were made at least 15 min after passing in whole-cell configuration to allow somatic diffusion of Rhod-2. Rhod-2 was excited with a 585 nm LED (Cool LED, Precise Excite) at an intensity of 150-300 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ and the filter set used for optogenetic stimulation using Imaging Workbench 6.1 software (Indec Byosystems). IR and fluorescence images were collected by alternating between the two emission filters using a filter wheel (Lambda 10B, Sutter Instruments). IR and fluorescence were respectively sampled at 5 Hz and 1 Hz during baseline and optogenetic stimulation and at 1 Hz and 0.2 Hz after photostimulation. During photostimulation the fluorescence of the EYFP fused with ChR2 ([\(Madisen et al., 2012\)](#)) contaminated the Rhod-2 fluorescence that could thus not be reliably analyzed during this period. To compensate for potential x-y drifts, all images were realigned off-line using the “StackReg” plug-in ([\(Thévenaz et al., 1998\)](#)) of ImageJ 1.53 software. To determine somatic

regions of interest (ROIs) the soma was manually delineated from IR images. Variations of fluorescence ($\Delta F/F_0$) intensity were expressed as the ratio $(F-F_0)/F_0$ where F corresponds to the mean fluorescence intensity in the ROI at a given time point, and F_0 corresponds to the mean fluorescence intensity in the same ROI during the 30 s control baseline.

Drugs

All pharmacological compounds were bath applied after a 5 min baseline and the vascular dynamics was recorded during bath application. The following drugs were used: D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5, 50 μ M, Hellobio, HB0225), 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 10 μ M, Hellobio, HB0262), LY367385 (100 μ M, Hellobio, HB0398) and BIBP3226 (1 μ M, Tocris, 2707) in water. Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M, L8503, Latoxan) in 90 % acetic acid. PGE2 (HB3460, Hellobio), 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP, 50 μ M, Hellobio, HB0426) and 9,11-Dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy prostaglandin F2 α (U-46619, 100 nM, Enzo, BML-PG023) in ethanol. Indomethacine (5 μ M, Sigma-Aldrich, I7378), SC-560 (100 nM, Sigma-Aldrich, S2064-5MG), NS-398 (10 μ M, Enzo, BML-EI261), ONO-8130 (10 nM, Tocris, 5406), L-798,106 (1 μ M, Cayman chemical, 11129), AL8810 (10 μ M, Cayman chemical, 16735), Paxilline (10 μ M, Tocris, 2006) and HET0016 (100 μ M, Merck, SML2416-5MG) in DMSO. Ethanol and DMSO doses were always used below 0.1% to avoid vascular interactions (Sun et al., 2010). Inhibitors and antagonists of the prostaglandin synthesis pathway, HET0016 and BIBP3226 were applied at least 30 min, TTX at least 15 min, antagonists of glutamate receptors at least 10 minutes and Paxilline at least 5 minutes prior optogenetic stimulation.

Vascular reactivity analysis

To compensate for potential x-y drifts, all images were realigned off-line using the “StackReg” plug-in (Thévenaz et al., 1998) of ImageJ 1.53 software. Luminal diameter was measured in layer I on registered images using custom analysis software developed in MATLAB (MathWorks) (Lacroix et al., 2015). To avoid potential drawbacks due to blood vessels instability, only arterioles exhibiting a stable luminal diameter were considered further. Arterioles were considered stable if the relative standard deviation (RSD) of their luminal diameter during the baseline period was under 5% (Lacroix et al., 2015). Intrinsic effect of blockers, inhibitors and antagonists on blood vessels was verified by comparing their mean luminal diameter during the 5 min baseline and the 5 lasts min bath applications preceding

optogenetic stimulation. Diameter changes ($\Delta D/D_0$) were expressed according to: $(D_t - D_0)/D_0$ where D_t was the luminal diameter at the time t and D_0 the average diameter during the 5 minutes baseline period. Vasomotor responses and their parameters were determined from the diameter changes curves [$\Delta D/D_0 = f(t)$] plotted using Clampfit 10.7 (MDS). Statistical thresholds for detecting vascular responses were defined at $D_0 \pm 1.960$ ($\alpha = 0.05$) or $\pm D_0 2.576$ ($\alpha = 0.01$) times the standard deviation measured during baseline periods for pharmacological or optogenetic responses, respectively. Vascular responses were considered as vasodilations or vasoconstriction when diameter changes crossed the positive or the negative threshold values, respectively (Supplementary Fig. 5). The onset and the end of vascular responses were defined at the time when the diameter changes exceeded and returned below these statistical thresholds for at least 1 min or 10 s, for pharmacological or optogenetic manipulations, respectively. The magnitude (Bakalova et al., 2002) of vascular responses was defined as the area under the curve of diameter changes following the onset of the response. When multiple responses were observed the magnitude of all events was summed. When no response was observed, the maximal diameter response and the magnitude were arbitrarily set to 0. Diameter changes traces for optogenetic experiments were smoothed with a sliding five-point median filter to eliminate sharp artifacts resulting from transient loss of focus.

Cytoplasm harvesting and single-cell RT-PCR

At the end of the whole-cell recording, lasting <15 min, the cytoplasmic content was collected in the recording pipette by applying a gentle negative pressure. The pipette's content was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μ l as described previously (Lambolez et al., 1992). The scRT-PCR protocols were designed to probe simultaneously the expression of prostaglandins synthesizing enzymes and neuronal markers (Ascoli et al., 2008; Karagiannis et al., 2009). Prostaglandins synthesizing enzymes included COX-1 and COX-2, the terminal PGE₂ synthases (PGES): mPGES1, mPGES2 and cPGES, the terminal PGF₂ α synthases (PGFS): PM-PGFS and AKR1B3 and the carbonyl reductase CBR1. Neuronal markers included the vesicular glutamate transporter, vGluT1, and the two isoforms of glutamic acid decarboxylase, GAD65 and GAD67. Two-step amplification was performed essentially as described (Cauli et al., 1997; Devienne et al., 2018). Briefly, cDNAs present in the 10 μ l reverse transcription reaction were first amplified simultaneously using all external

primer pairs listed in Supplementary table 2. Taq polymerase (2.5 U; Qiagen) and external primers mix (20 pmol each) were added to the buffer supplied by the manufacturer (final volume, 100 μ l), and 20 cycles (95°C, 30 s; 60°C, 30 s; and 72°C, 35 s) of PCR were run. Second rounds of PCR were performed using 1 μ l of the first PCR product as a template. In this second round, each cDNA was amplified individually using its specific nested primer pair (Supplementary table 2) by performing 35 PCR cycles (as described above). 10 μ l of each individual PCR product were run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide using Φ X174 digested by *HaeIII* as a molecular weight marker.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Normality of distribution were assessed using the Shapiro-Wilk normality tests. Equality of variances was assessed using Brown-Forsythe tests for comparison between groups and using F tests for comparison to a control group. Parametric tests were only used if these criteria were met. Statistical significance of morphological and physiological properties of diving arterioles was determined using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test for comparison between groups and using two-sided unpaired t tests or Mann-Whitney *U* tests for comparison to a control group. Statistical significance of vascular responses was determined using Mann-Whitney *U* tests. Bonferroni-Holm correction was used for multiple comparison. Statistical significance on all figures uses the following convention: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Supplementary methods

Intrinsic optical signals analysis

We ensured that no cortical spreading depression was triggered by pyramidal cells optogenetic stimulation (Chung et al., 2018) which can lead to vasoconstriction (Lauritzen, 1984; Schain et al., 2017). Variations of transmittance (ΔT) of intrinsic optical signals (IOS) were determined using ImageJ 1.53 software according to: $\Delta T = (T_t - T_0) / T_0$ where T_t corresponds to the light transmittance at a time t and T_0 is the average light transmittance during the baseline period of a squared region of interest of 100 μ m x 100 μ m manually delineated in layer I. The rate of IOS change was determined as the first derivative of ΔT ($d\Delta T/dt$, where ΔT is the change of IOS and t is time). Slices presenting a maximal rise rate of

IOS that exceed 2%/s, indicating the occurrence of spreading depression (Zhou et al., 2010) were discarded.

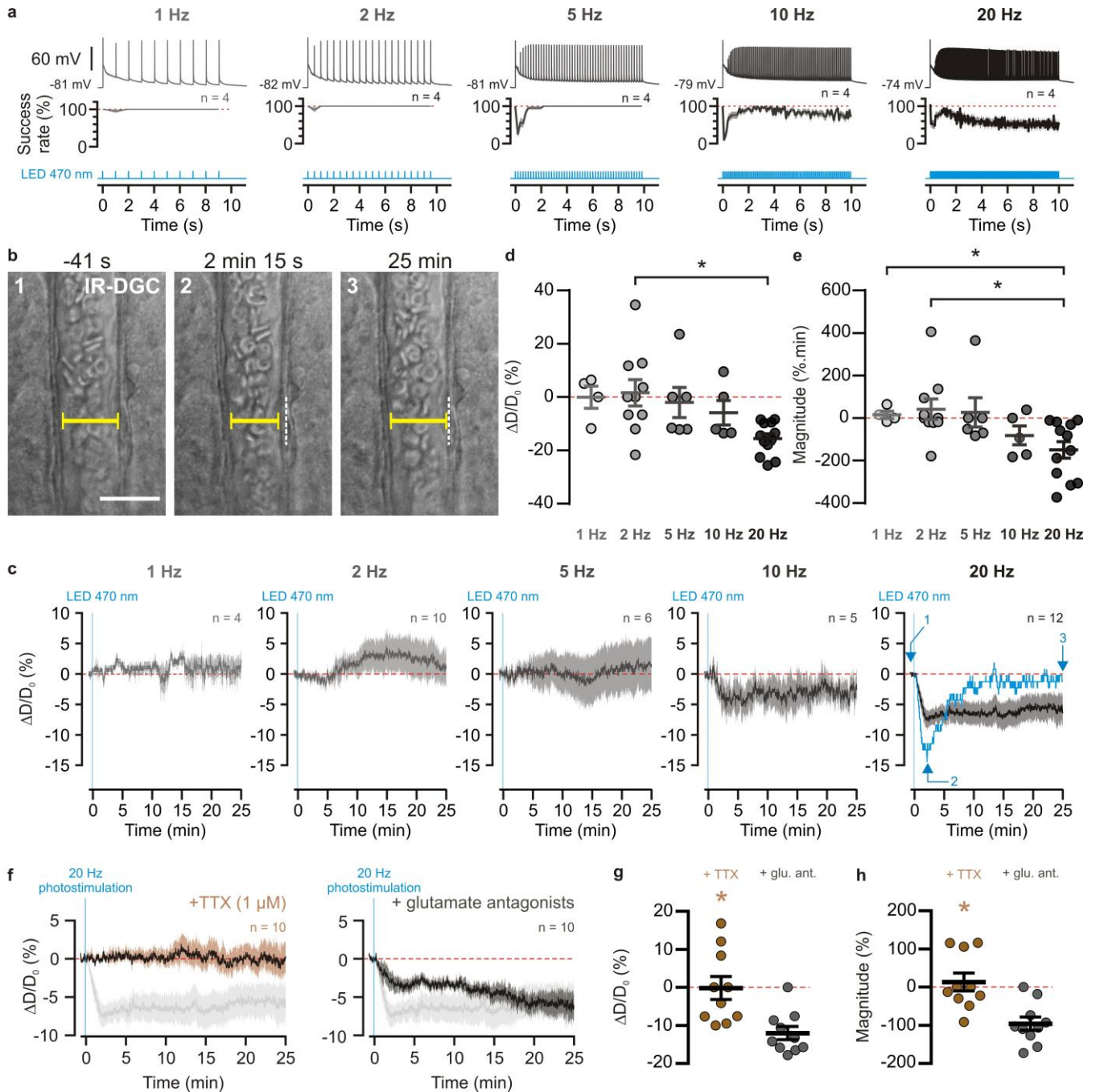


Figure 1: Polarity of the neurovascular response depends on the photostimulation frequency of pyramidal neurons. (a) Representative example showing the voltage responses of a pyramidal neuron (upper traces light grey to black traces) induced by photostimulations (470 nm, 10 s duration, 5 ms pulses) at 1, 2, 5, 10 and 20 Hz (blue lower traces) and mean success rate of action potential emission (middle trace, $n=4$ cells). The SEM envelopes the mean traces. Dashed lines represent 100% of success rate. (b) Representative example showing IR-DGC images of a layer I diving arteriole (1) before a 20 Hz photostimulation, (2) at the maximal diameter decrease, and (3) at the end of the recording. Pial surface is upward. Yellow lines indicate the measured luminal diameter. White dashed lines indicate the initial position of the vessel wall. Scale bar: 25 μ m. (c,d) Effects of the different frequencies of photostimulation on (c) absolute maximal amplitude and (d) magnitude of vascular responses. (e) Kinetics of arteriolar diameter changes induced by photostimulation (vertical blue bar) at 1 Hz ($n=4$ arterioles from 3 mice), 2 Hz ($n=10$ arterioles from 8 mice), 5 Hz ($n=6$ arterioles from 6 mice), 10 Hz ($n=5$ arterioles from 5 mice) and 20 Hz ($n=12$ arterioles from 11 mice). The blue trace represents the kinetics of diameter changes of the arteriole shown in (b). Effect of TTX (1 μ M, brown, $n=10$ arterioles from 6 mice) and cocktail antagonists of AMPA, kainate (DNQX, 10 μ M), NMDA (D-AP5, 50 μ M), mGluR1 (LY367385, 100 μ M) and mGluR5 (MPEP, 50 μ M) receptors (grey, $n=10$ arterioles from 6 mice) on (f) kinetics, (g) amplitude and (h) magnitude of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation (vertical blue bar). The SEM envelopes the mean traces. Horizontal dashed lines represent the initial diameter. The shadow traces are the control condition of the kinetic of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation. Data are presented as the individual values and mean \pm SEM. * statistically different with $p < 0.05$.

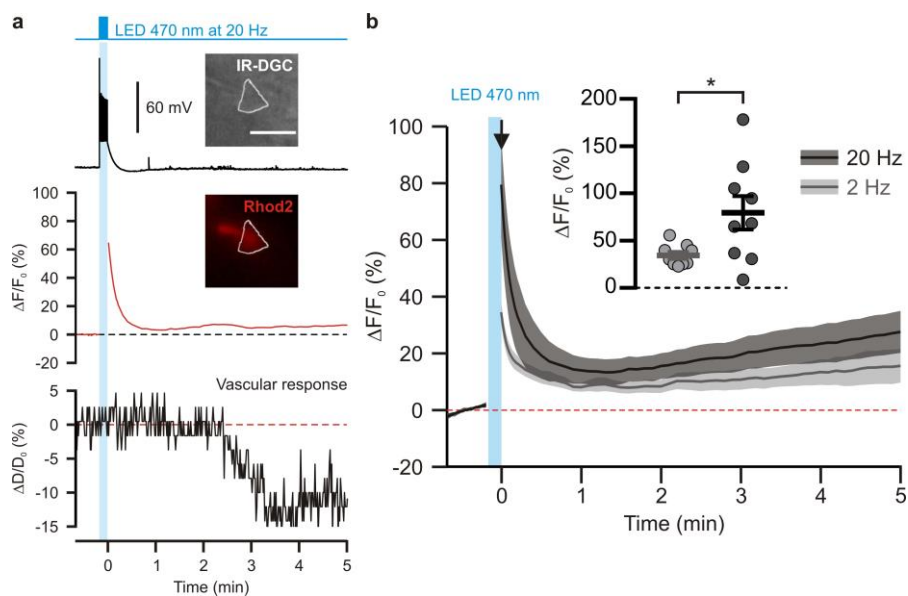


Figure 2: Photostimulation of pyramidal neurons evokes a restricted firing and frequency-dependent calcium increase. (a). Voltage responses (upper trace), kinetics of relative fluorescence variations (middle trace) and arteriolar diameter (lower trace) changes induced by photostimulation at 20 Hz. Insert, IR-DGC (upper) and Rhod2 fluorescence (middle) images of a recorded layer II/III pyramidal neuron. Somatic region of interest is delineated in white. Pial surface is upward. Scale bar: 20 μ m. **(b)** Mean relative variations of Ca²⁺ fluorescence in response to photostimulation at 2 Hz (grey) and 20 Hz (black). Dashed line represents the baseline. Vertical blue bar indicates the period of photostimulation. The SEM envelopes the mean traces. Insert, Maximal increase of relative fluorescence variations induced right after photostimulation pointed by the black arrow. The data are shown as the individual values and mean \pm SEM. * statistically different with $p < 0.05$.

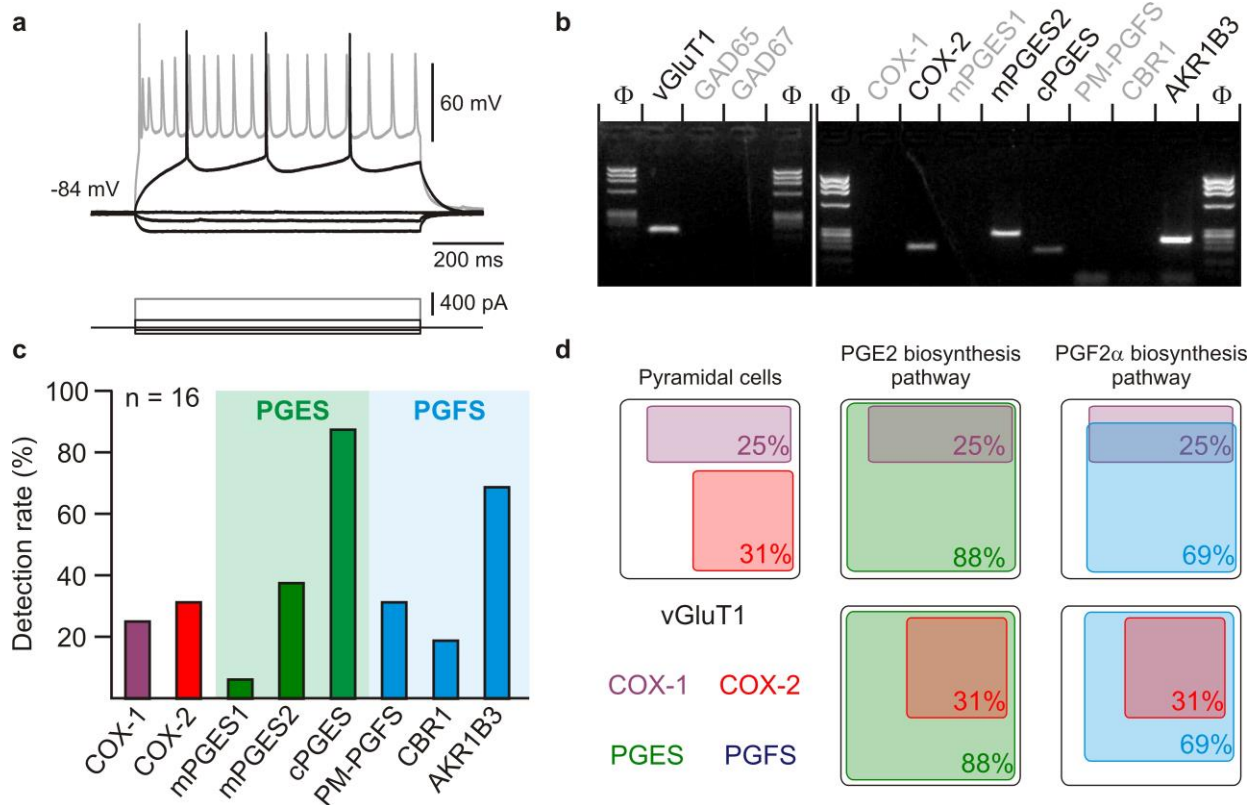


Figure 3: Expression profile of PGE₂ and PGF₂ α synthesizing enzymes. (a) Voltage responses induced by injection of current (bottom traces) in a layer II-III pyramidal neuron in current-clamp mode. In response to a just-above-threshold current pulse, the neuron fired action long lasting potentials with little frequency adaption (middle black traces). Near saturation, it exhibits pronounced spike amplitude accommodation and marked frequency adaptation (upper grey trace). (b) Agarose gel analysis of the scRT-PCR products of the pyramidal neuron shown in (a) showing expression of vGluT1, COX-2, mPGES2, cPGES, PM-PGFS and CBR1. Φ x174 digested by *HaeIII* (Φ) was used as molecular weight marker (c) Histogram summarizing the detection rate of vasoconstrictive prostaglandins synthesizing enzymes in vGluT1-expressing layer II-III pyramidal neurons (n=16 cells from 6 mice). PGES (green zone) corresponds to mPGES1, mPGES2 and/or cPGES and PGFS (blue zone) to PM-PGFS, CBR1 and/or AKR1B3. (d) Co-expression of vasoconstrictive prostaglandins synthesizing enzymes in pyramidal neurons. The box size is proportional to the detection rate. Note the absence of co-expression between COX-1 (left, purple) and COX-2 (red). Co-expression of a PGES (middle, green) and a PGFS (right, blue) with COX-1 (up) and COX-2 (bottom) in vGluT1-positive pyramidal neurons (black).

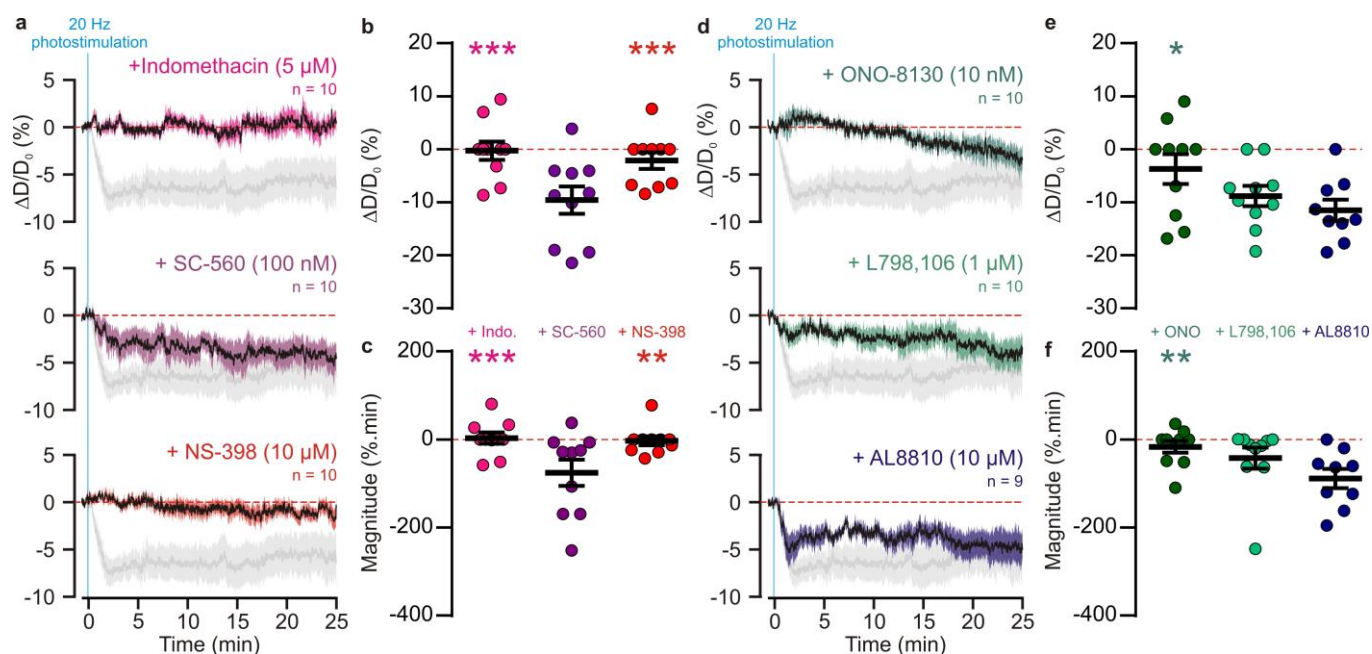


Figure 4: COX-2 derived PGE2 acting on EP1 and EP3 is necessary for vasoconstrictions induced by optogenetically-activated pyramidal neurons. Effect of COX inhibitors indomethacin (magenta, $n=10$ arterioles from 9 mice), SC-560 (purple, $n=10$ arterioles from mice) and NS-398 (red, $n=10$ arterioles from 8 mice) on **(a)** kinetics, **(b)** amplitude and **(c)** magnitude of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation (vertical blue bar). Effect of antagonists ONO-8130 (10 nM, green, $n=10$ arterioles from 7 mice), L798,106 (1 μM , cyan, $n=10$ arterioles from 5 mice) and AL8810 (10 μM , dark blue, $n=9$ arterioles from 7 mice) on **(d)** kinetics, **(e)** amplitude and **(f)** magnitude of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation. Dashed line represents the baseline. The SEM envelopes the mean traces. The data are shown as the individual values and mean \pm SEM. The shadow traces are the control condition of the kinetic of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation. *, ** and *** statistically different from 20 Hz control condition (Fig. 1e) with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

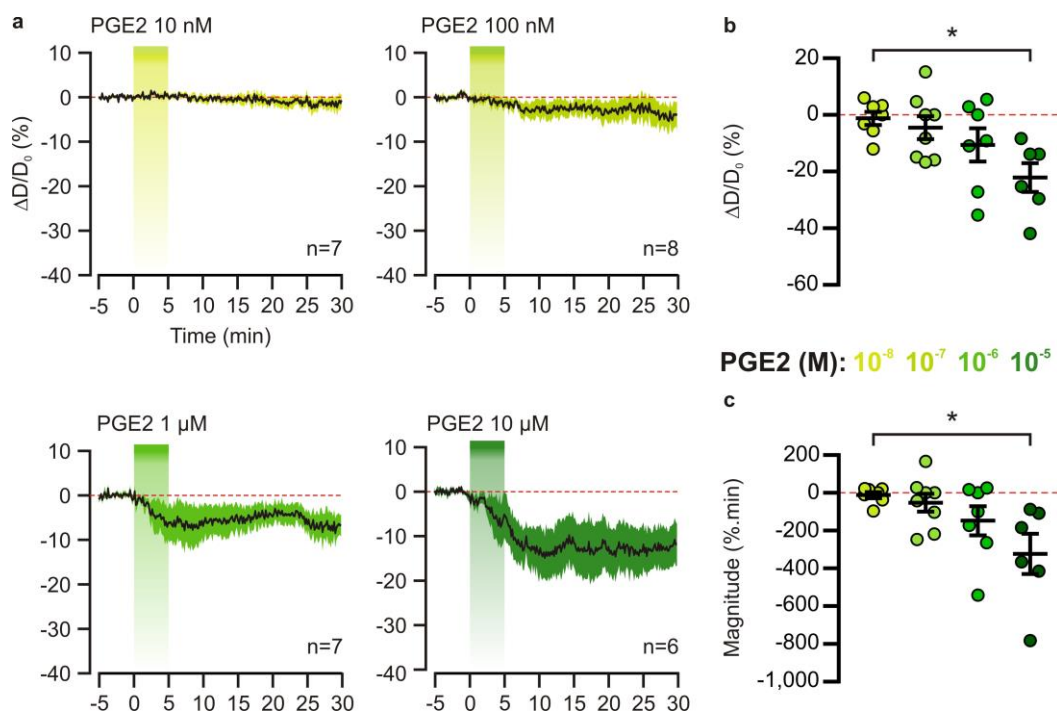


Figure 5: PGE2 can induce vasoconstriction but also vasodilation. (a) Kinetics of arteriolar diameter changes induced by exogenous PGE2 application (vertical green zones) at (a) 10 nM (n=7 arterioles from 4 mice), 100 nM (n=8 arterioles from 5 mice), 1 μ M (n=7 arterioles from 4 mice) and 10 μ M (n=6 arterioles from 4) (light to dark green) Dashed line represents the baseline. The SEM envelopes the mean traces. **(b, c)** Dose-dependent effect of PGE2 on (b) maximal diameter changes and (c) magnitude of vascular responses. The data are shown as the individual values and mean \pm SEM. * statistically different with $p < 0.05$.

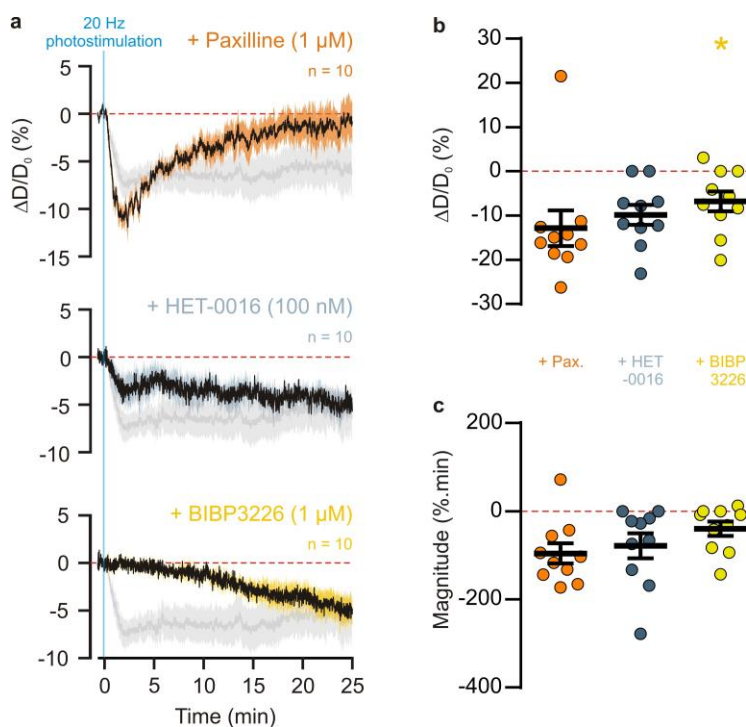


Figure 6: NPY Y1 receptors activation are required for the initial phase of vasoconstriction induced by pyramidal neurons. Effects of paxilline (1 μ M, orange, n=10 arterioles from 6 mice), HET-0016 (100 nM, blue-grey, n=10 arterioles from 7 mice) and BIBP3226 (1 μ M, yellow, n=10 arterioles from 6 mice) on **(a)** kinetics, **(b)** amplitude and **(c)** magnitude of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation (vertical blue bar). Dashed line represents the baseline. The SEM envelopes the mean traces. The shadow traces are the control condition of the kinetic of arteriolar vasoconstriction induced by 20 Hz photostimulation. The data are shown as the individual values and mean \pm SEM. * statistically different from 20 Hz control condition (Fig. 1e) with $p < 0.05$.

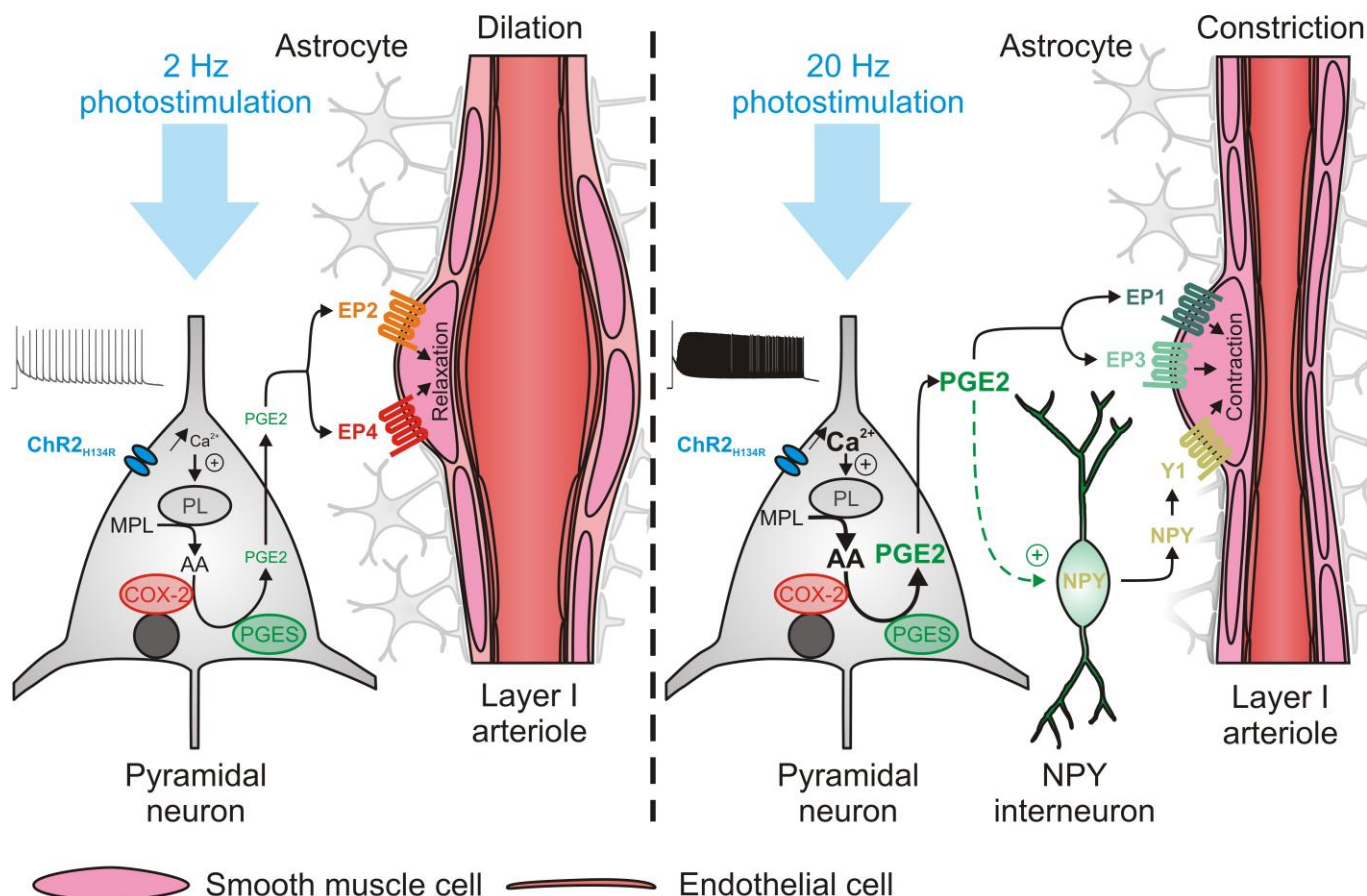
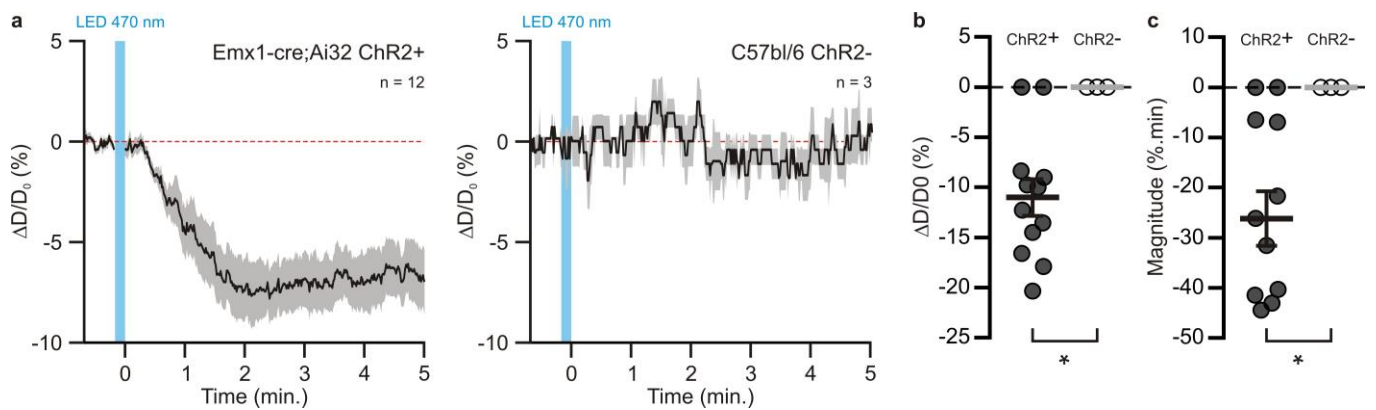


Figure 7: Possible mechanisms of the bidirectional control of neurovascular coupling by pyramidal neurons. (Left) 2 Hz photostimulation induce moderate activation of pyramidal neurons expressing channelrhodopsin-2 (ChR2_{H134R}) and moderate elevations of intracellular calcium (Ca²⁺). Acid arachidonic (AA) is released from membrane phospholipids (MPL) by phospholipases (PL) activated by intracellular Ca²⁺ and metabolized by type-2 cyclooxygenase (COX-2) and prostaglandin E2 synthases (PGES) to produce prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 released into extracellular space acts on EP2 and EP4 receptors to induce relaxation of smooth muscle cells and vasodilation of layer I arterioles. (Right) 20 Hz photostimulation switches vasodilation into vasoconstriction by higher neuronal activation and higher calcium increases in pyramidal neurons, releasing more AA from MPL and producing more PGE2. Contraction of smooth muscle cells and vasoconstriction are induced by PGE2 acting on EP1 and EP3 receptors and also neuropeptide Y (NPY) released by NPY interneurons, possibly activated by PGE2.

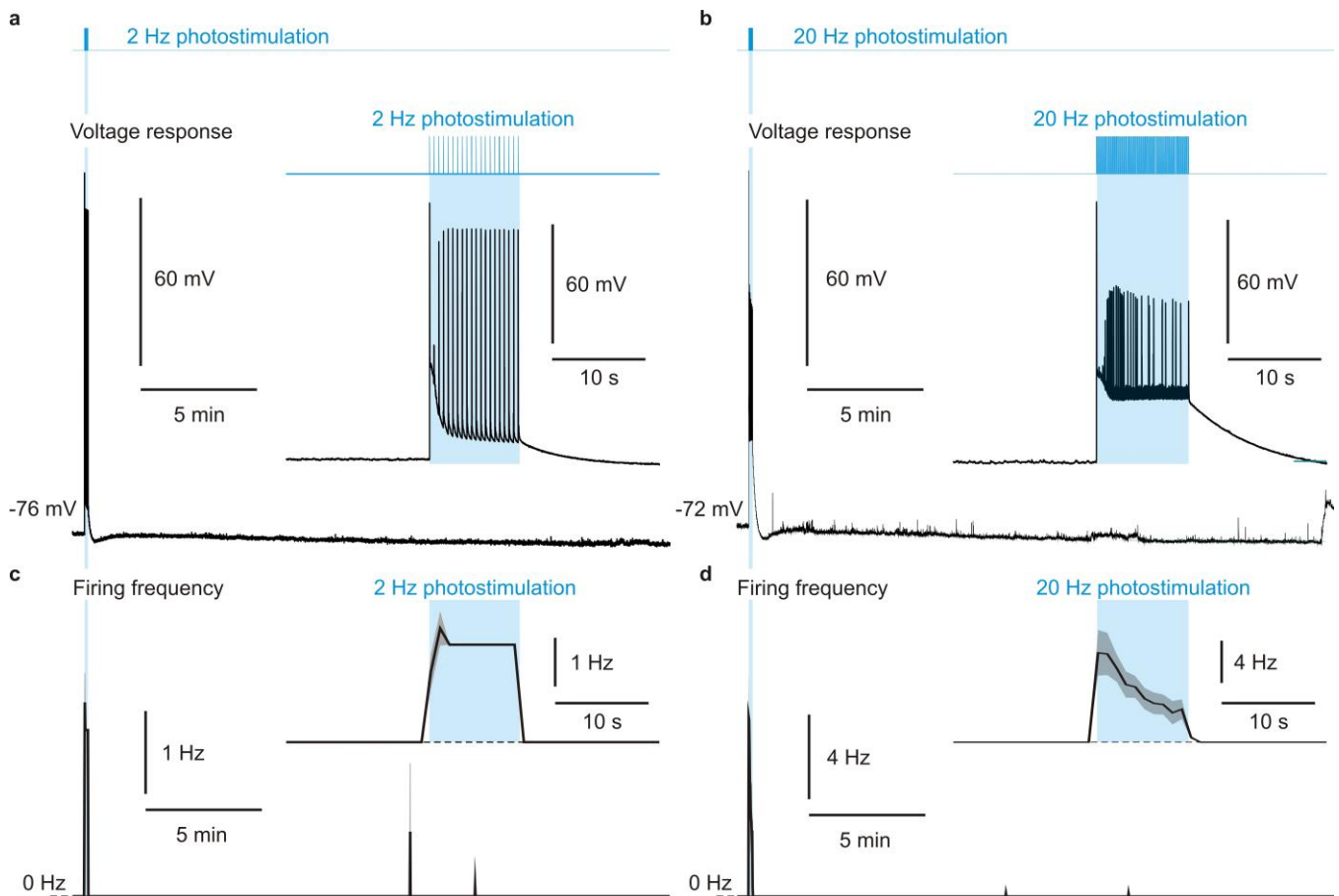
Supplementary table 1: Morphological and physiological properties of diving arterioles used in the analysis of the polarity of the neurovascular response evoked by pyramidal neurons.

Frequency Number of arterioles	1 Hz n = 4	2 Hz n = 10	5 Hz n = 6	10 Hz n = 5	20 Hz n = 12
Resting stability (%)	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2 F (4, 32) = 0.81 p = 0.231417 n.s.	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Luminal diameter (µm)	16.2 ± 1.8	13.3 ± 0.9	15.2 ± 1.8 H = 6 p = 0.199114 n.s.	15.9 ± 1.5	17.5 ± 1.5
Wall thickness (µm)	3.6 ± 0.8	3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.5 F (4, 32) = 0.903 p = 0.473852 n.s.	4.1 ± 0.8	4.2 ± 0.2
Maximal rate of IOS changes (%.s-1)	0.19 ± 0.09	0.64 ± 0.14	0.22 ± 0.04 All < 2 %.s-1	0.43 ± 0.19	0.8 ± 0.11

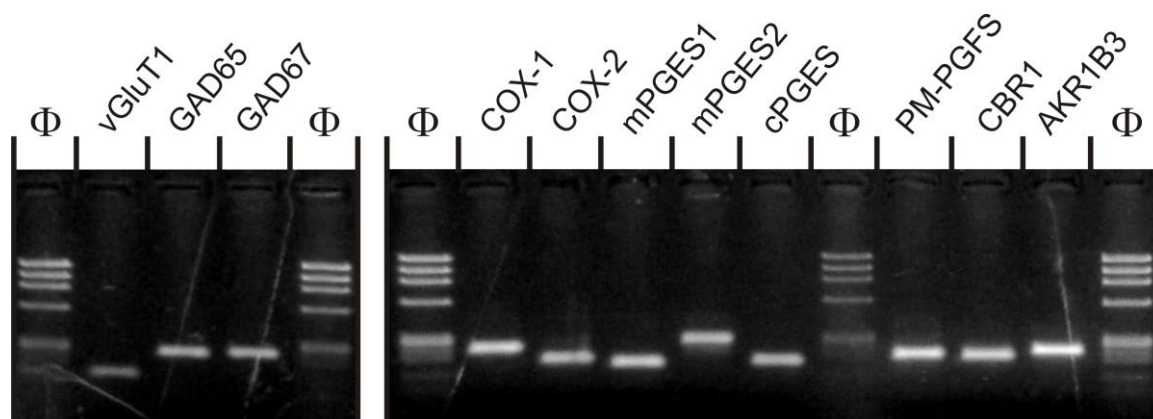
Data are mean ± SEM, one-way ANOVA F test or Kruskal-Wallis H test and corresponding exact p-value. n.s., not statistically different.



Supplementary Figure 1: Vasoconstrictions are specific of pyramidal neurons optogenetic activation. (a) Kinetics of vascular responses induced by photostimulation at 20 Hz in cortical brain slices of *Emx1-cre;Ai32* mice expressing the ChR2 (black, n=12 arterioles) or naive *C57bl/6* mice (light grey, n=3 arterioles). Dashed line represents the baseline. The SEM envelopes the mean traces. (b,c) Effect of ChR2 expression on absolute maximal diameter changes (b) and magnitude (c) on vascular responses evoked by photostimulation at 20 Hz. The data are shown as the individual values and mean \pm SEM. * statistically different with $p < 0.05$.



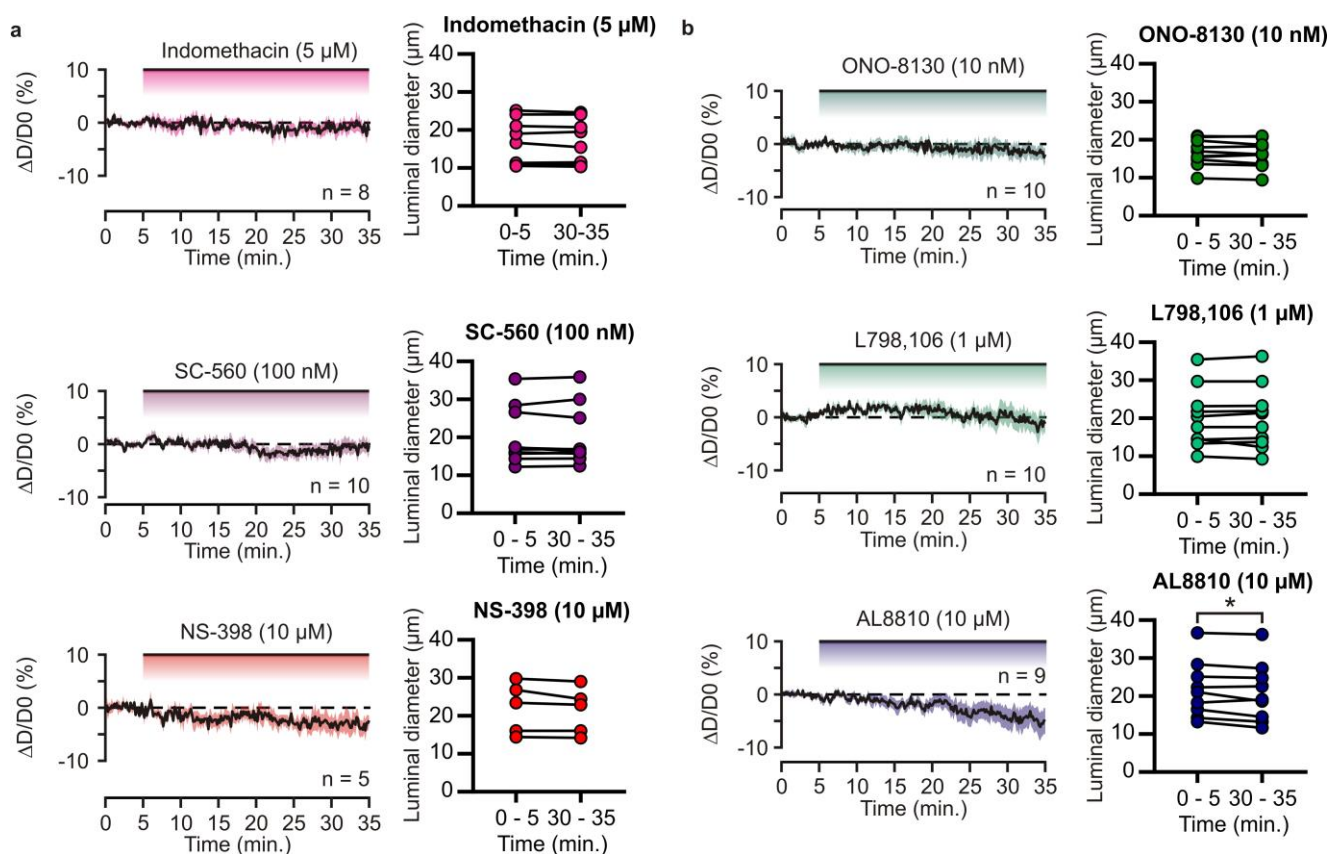
Supplementary Figure 2: Photostimulation of pyramidal neurons did not induce any noticeable recurrent network activity triggering spikes. (a) Photostimulation (upper traces) at 2 Hz (left panel) and 20 Hz (right panel) and representative voltage responses during photostimulation (vertical blue bar). Insets represent voltage responses during photostimulation (blue zones). (b) Mean firing frequency of pyramidal neurons (bottom traces) at 2 Hz (left, grey, n=9) and at 20 Hz (right, black, n=9). Note the sporadic action potentials after the photostimulation period. Insets represent mean firing frequency during the forty seconds around photostimulation periods. Dashed line represents the 0 Hz baseline. The SEM envelopes the mean traces.



Supplementary Figure 3: Sensitivity of the RT-mPCR. Agarose gel analysis of the RT-PCR performed from 500 pg of forebrain total RNAs Φ x174 digested by *HaeIII* (Φ) was used as molecular weight marker. All the amplicons were detected with the expected sized from the gene sequences (supplementary Table 2).

Supplementary table 2: PCR primers

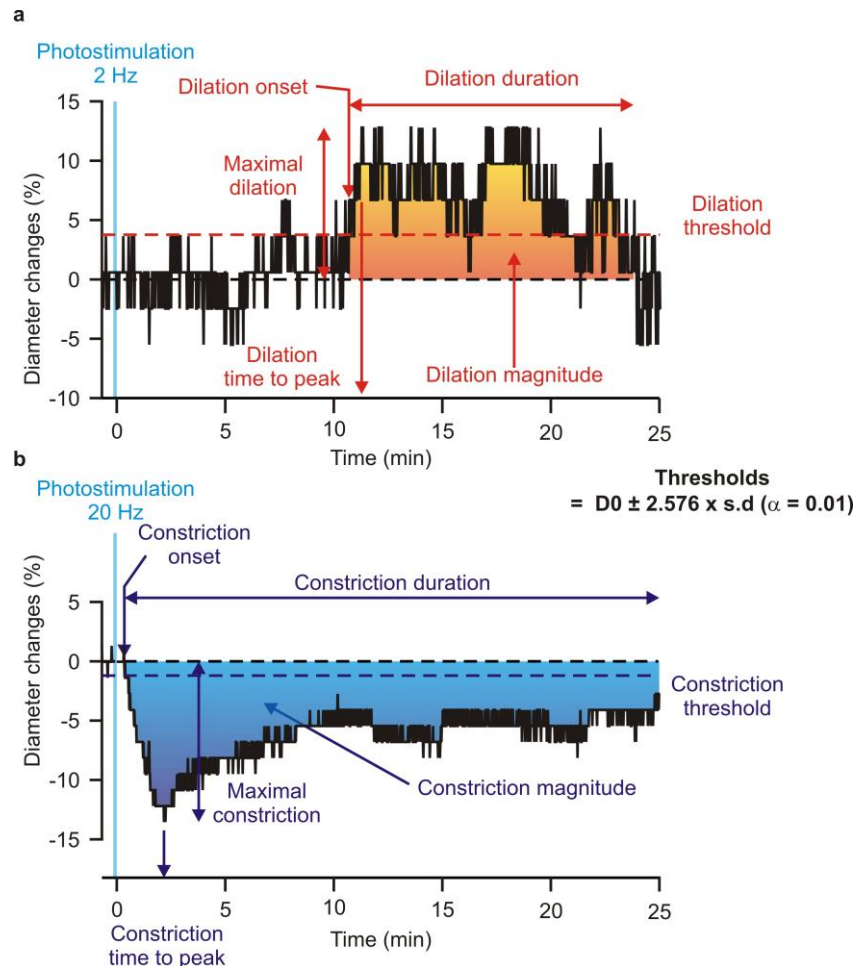
Gene accession #	First PCR primers	Size (bp)	Second PCR nested primers	Size (bp)
vGluT1 NM_182993	Sense, -113: GGCTCCTTTTCTGGGGCTAC (Cabezas et al., 2013) Antisense, 126: CCAGCCGACTCCGTTCTAAG (Gallopín et al., 2006)	259	Sense, -54: ATTCGACGCCAACAGGGTCT (Cabezas et al., 2013) Antisense, 79: TGGCAAGCAGGGTATGTGAC (Cabezas et al., 2013)	153
GAD65 NM_008078	Sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG (Karagiannis et al., 2009) Antisense, 454: TCCTCCAGATTTGCGGTTG (Karagiannis et al., 2009)	375	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCT (Perrenoud et al., 2012) Antisense, 447: GATTTTGGGTTGGTCTGCC (Perrenoud et al., 2012)	248
GAD67 NM_008077	Sense, 529: TACGGGGTTCGCACAGGTC (Férézou et al., 2002) Antisense, 1,109: CCCAGGCAGCATCCACAT (Cabezas et al., 2013)	598	Sense, 801: CCCAGAAGTGAAGACAAAAGGC (Cabezas et al., 2013) Antisense, 1,034: AATGCTCCGTAACAGTCGTGC (Cabezas et al., 2013)	255
COX1 NM_008969	Sense, 107: ATCCCTGTTGTACTATCCGTGC Antisense, 470: TGTGGGGCAGTCTTTGGGTA	383	Sense, 137: AGGGTGTCTGTGTCGGCTTT Antisense, 366: GGCTGGGGATAAGGTTGGAC	249
COX2 NM_011198	Sense, 199: CTGAAGCCACCCCAAACAC (Lecrux et al., 2011) Antisense, 445: CCTTATTTCCCTTCACACCCAT (Devienne et al., 2018)	268	Sense, 265: AACAAATCCCTTCCTGCG (Devienne et al., 2018) Antisense, 426: TGGGAGTTGGGCAGTCATCT (Devienne et al., 2018)	181
mPGES1 NM_022415	Sense, 14: GCCTGGTGATGGAGAGCG Antisense, 367: GGAGCGAAGGCGTGGGTT	371	Sense, 110: AGATGAGGCTGCGGAAGAAG Antisense, 248: CACGAAGCCGAGGAAGAGGA	158
mPGES2 NM_133783	Sense, 357: CGACTTCCACTCCCTGCC Antisense, 374: CATCTCCTCCGTCCTGGCTT	337	Sense, 388: GAGGTGAATCCCGTGAGAAGG Antisense, 656: TTCCTTCCCGCCATACATCT	288
cPGES NM_019766	Sense, 190: TCCAAGCATAAAAGAACAGACAGA Antisense, 448: TGGCATCTTTTCATCATCACTGTC	282	Sense, 266: TAACAAAGGAAAGGGCAAAGC Antisense, 416: CATCATCTGCTCCATCTACTTCTG	174
PM-PGFS NM_025582	Sense, 236: AGGAGTTTCTGGATGGTGGTTAC Antisense, 584: CACCTCCACACACCTTCTCAT	370	Sense, 360: ACCTGTTCTGTATGTAGCCTCC Antisense, 562: CTGGGGTGGCTTGCTGGA	220
Akr1b3 NM_009658	Sense, 148: CAGAATGAGAAGGAGGTGGGA Antisense, 467: TTGAAGTTGGAGACCCGATTG	341	Sense, 189: CAAGGAGCAGGTGGTGAAGC Antisense, 416: CATAGCCGTCCAAGTGTCCA	247
CBR1 NM_007620	Sense, 196: AACCCGCAGAGCATTGCG Antisense, 551: GCCAACCTTCTCCGCAT	373	Sense, 291: CAATGACGACCCCTTCC Antisense, 477: CTCCTGTGATGGTCTCGCTT	208



Supplementary Figure 4: Tonic prostaglandins do not regulate basal vascular tone. (a,b) Kinetics of diameter changes (left panels) and comparison of the mean luminal diameter between the five minutes control period and the five minutes following 30 minutes treatment by (a) indomethacin (5 μM , magenta, n=8 arterioles), SC-560 (100 nM, purple, n=10 arterioles), NS-398 (10 μM , red, n=5 arterioles), (b) ONO-8130 (10 nM, dark green, n=10 arterioles), L-798,106 (1 μM , cyan, n=10 arterioles), AL8810 (10 μM , dark blue, n=9 arterioles).

Supplementary table 3: IC₅₀ and concentrations of inhibitors, blocker and antagonists used in tissue.

Inhibitor/antagonist	In vitro IC ₅₀	Concentrations used for inhibition/antagonism		
		Preparation	Concentration	
Indomethacin	COX-1: 22 nM (Lora et al., 1998)	COX-2: 87 nM	Mouse brain slices (Zonta et al., 2003; Lacroix et al., 2015)	5 µM
SC560	COX-1: 9 nM (Smith et al., 1998)	COX-2: 6.3 µM	Mouse brain slices (Blanco et al., 2008; Lacroix et al., 2015)	100 nM
NS-398	COX-1: 50 µM (Lora et al., 1998)	COX-2: 0.6 µM	Mouse brain slices (Slanina and Schweitzer, 2005; Lacroix et al., 2015)	10 µM
ONO-8130	EP1 receptors: 9.3 nM (Säfholm et al., 2013a)		isolated guinea pig trachea (Säfholm et al., 2013b)	10 nM
L798,106	EP3 receptors: 0.3 nM (Ki) (Juteau et al., 2001)		Isolated mouse mesenteric arteries (Chia et al., 2011)	1 µM
AL8810	FP receptors: 426 nM (Ki) (Griffin et al., 1999)		Isolated porcine retinal arterioles (Hansen et al., 2015)	10 µM
Paxilline	BK channels: 97 nM (Tammamo et al., 2004)		Mouse brain slices (Girouard et al., 2010)	1 µM
HET-0016	CYP4A isoforms: 35 nM (Miyata et al., 2001)		Mouse brain slices (Blanco et al., 2008)	100 nM
BIBP3226	Y1 receptors: 26 nM (Rudolf et al., 1994)		Mouse brain slices Bacci et al 2002	1 µM



Supplementary Figure 5: Example of detection and analysis parameters of vascular responses. Here, statistical thresholds for detecting vascular responses were defined at $\pm D0 \pm 2.576$ ($\alpha = 0.01$) times the standard deviation measured during baseline periods after photostimulation of pyramidal neurons at 20 Hz. Vascular responses were considered as vasodilations (red) or vasoconstriction (blue) when diameter changes crossed the positive or the negative threshold values, respectively. The onset and the end when of vascular responses were defined at the time when the diameter changes exceeded and returned below these statistical thresholds for at least 10 s.

References

- Abounader, R., Villemure, J.G., and Hamel, E. (1995). Characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors in human cerebral arteries with selective agonists and the new Y1 antagonist BIBP 3226. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 2245–2250.
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., et al. (2008). Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* *468*, 232–243.
- Bakalova, R., Matsuura, T., and Kanno, I. (2002). The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduce regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats. *Exp. Biol. Med.* *227*, 465–473.
- Bergel, A., Deffieux, T., Demené, C., Tanter, M., and Cohen, I. (2018). Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat. Commun.* *9*.
- Bezzi, P., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Volterra, A., Carmignoto, G., Pasti, L., and Pozzan, T. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* *391*, 281–285.
- Blanco, M., Stern, J.E., and Filosa, J.A. (2008). Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am. J. Physiol.* 2855–2863.
- Cabezas, C., Irinopoulou, T., Cauli, B., and Ponce, J.C. (2013). Molecular and functional characterization of GAD67-expressing, newborn granule cells in mouse dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* *7*, 1–16.
- Cauli, B., and Hamel, E. (2010). Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front. Neuroenergetics* *2*, 9.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., and Rossier, J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* *17*, 3894–3906.
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., and Audinat, E. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 6144–6149.
- Cauli, B., Tong, X.K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., and Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: Relays for subcortical vasoactive pathways. *J. Neurosci.* *24*, 8940–8949.
- Di Cesare, A., Del Piccolo, P., Zacchetti, D., and Grohovaz, F. (2006). EP2 receptor stimulation promotes calcium responses in astrocytes via activation of the adenylyl cyclase pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 2546–2553.
- Chia, E., Kagota, S., Wijekoon, E.P., and McGuire, J.J. (2011). Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in

mice. *BMC Pharmacol.* *11*.

Choi, M., Yoon, J., and Choi, C. (2010). Label-free optical control of arterial contraction. *J. Biomed. Opt.* *15*, 015006.

Chung, D.Y., Sadeghian, H., Qin, T., Lule, S., Lee, H., Karakaya, F., Goins, S., Oka, F., Yaseen, M.A., Houben, T., et al. (2018). Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb. Cortex* *29*, 1–12.

Clasadonte, J., Poulain, P., Hanchate, N.K., Corfas, G., Ojeda, S.R., and Prevot, V. (2011). Prostaglandin E 2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16104–16109.

Czigler, A., Toth, L., Szarka, N., Szilágyi, K., Kellermayer, Z., Harci, A., Vecsernyes, M., Ungvari, Z., Szolics, A., Koller, A., et al. (2020). Prostaglandin E2, a postulated mediator of neurovascular coupling, at low concentrations dilates whereas at higher concentrations constricts human cerebral parenchymal arterioles. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *146*, 106389.

Dabertrand, F., Hannah, R.M., Pearson, J.M., Hill-Eubanks, D.C., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (2013). Prostaglandin E2, a postulated astrocyte-derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 479–482.

Devienne, G., Le Gac, B., Piquet, J., and Cauli, B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp. *J. Vis. Exp.* *136*, 1–12.

Dodt, H.U., and Zieglgänsberger, W. (1998). Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem. J.* *30*, 141–152.

Férézou, I., Cauli, B., Hill, E.L., Rossier, J., Hamel, E., and Lambolez, B. (2002). 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* *22*, 7389–7397.

Gallopín, T., Geoffroy, H., Rossier, J., and Lambolez, B. (2006). Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex* *16*, 1440–1452.

Girouard, H., Bonev, A.D., Hannah, R.M., Meredith, A., Aldrich, R.W., and Nelson, M.T. (2010). Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3811–3816.

Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* *22*, 6309–6314.

Griffin, B.W., Klimko, P., Crider, J.Y., and Sharif, N.A. (1999). AL-8810: A novel prostaglandin F₂ analog with selective antagonist effects at the prostaglandin F₂ (FP) receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *290*, 1278–1284.

Hansen, P.O., Kringelholm, S., Simonsen, U., and Bek, T. (2015). Hypoxia-induced relaxation of porcine retinal arterioles in vitro depends on inducible NO synthase and EP 4 receptor stimulation in the perivascular retina. 457–463.

Juteau, H., Gareau, Y., Labelle, M., Sturino, C.F., Sawyer, N., Tremblay, N., Lamontagne, S., Carrière, M.C., Denis, D., and Metters, K.M. (2001). Structure-activity relationship of cinnamic

acetylsulfonamide analogues on the human EP3 prostanoid receptor. *Bioorganic Med. Chem.* **9**, 1977–1984.

Kaplan, L., Chow, B.W., and Gu, C. (2020). Neuronal regulation of the blood–brain barrier and neurovascular coupling. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 416–432.

Karagiannis, A., Gallopin, T., Dávid, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., Hillman, E.M.C., Staiger, J.F., and Cauli, B. (2009). Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* **29**, 3642–3659.

Lacroix, A., Toussay, X., Anenberg, E., Lecrux, C., Ferreirós, N., Karagiannis, A., Plaisier, F., Chausson, P., Jarlier, F., Burgess, S.A., et al. (2015). COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **35**, 11791–11810.

Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F., and Rossier, J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron* **9**, 247–258.

Lauritzen, M. (1984). Long-lasting reduction of cortical blood flow of the rat brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **4**, 546–554.

Lauritzen, M. (2005). Reading vascular changes in brain imaging: Is dendritic calcium the key? *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 77–85.

Lecrux, C., Toussay, X., Kocharyan, A., Fernandes, P., Neupane, S., Levesque, M., Plaisier, F., Shmuel, A., Cauli, B., and Hamel, E. (2011). Pyramidal Neurons Are “Neurogenic Hubs” in the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *J. Neurosci.* **31**, 9836–9847.

Lin, J.Y. (2011). A user’s guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp. Physiol.* **96**, 19–25.

Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., and Tsien, R.Y. (2009). Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys. J.* **96**, 1803–1814.

Logothetis, N.K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* **453**, 869–878.

Lora, M., Denault, J.B., Leduc, R., and De Brum-Fernandes, A.J. (1998). Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **59**, 55–62.

Lovick, T.A., and Stezhka, V. V. (1999). Neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter in coronal slices of rat midbrain: Electrophysiological and morphological characteristics. *Exp. Brain Res.* **124**, 53–58.

Ma, Y., Shaik, M.A., Kozberg, M.G., Kim, S.H., Portes, J.P., and Timerman, D. (2016). Resting-state hemodynamics are spatiotemporally coupled to synchronized and symmetric neural activity in excitatory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J., Berenyi, A., Fujisawa, S., Hsu, Y.-W. a, Garcia, A.J., Gu, X., Zanella, S., et al. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* **15**, 793–802.

- Miyata, N., Taniguchi, K., Seki, T., Ishimoto, T., Sato-Watanabe, M., Yasuda, Y., Doi, M., Kametani, S., Tomishima, Y., Ueki, T., et al. (2001). HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br. J. Pharmacol.* *133*, 325–329.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* *431*, 195–199.
- Niessing, J., Ebisch, B., Schmidt, K.E., Niessing, M., Singer, W., and Galuske, R.A.W. (2005). Neuroscience: Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* (80-.). *309*, 948–951.
- Niwa, K., Araki, E., Morham, S.G., Ross, M.E., and Iadecola, C. (2000). Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J. Neurosci.* *20*, 763–770.
- Perrenoud, Q., Rossier, J., Férézou, I., Geoffroy, H., Gallopin, T., Vitalis, T., and Rancillac, A. (2012). Activation of cortical 5-HT₃ receptor-expressing interneurons induces NO mediated vasodilatations and NPY mediated vasoconstrictions. *Front. Neural Circuits* *6*, 1–13.
- Rancillac, A., Rossier, J., Guille, M., Tong, X.-K., Geoffroy, H., Amatore, C., Arbault, S., Hamel, E., and Cauli, B. (2006). Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J. Neurosci.* *26*, 6997–7006.
- Rudolf, K., Eberlein, W., Engel, W., Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M., Wienen, W., Beck-Sickingler, A.G., and Doods, H.N. (1994). The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.* *271*, 5–7.
- Rungta, R.L., Osmanski, B.-F., Boido, D., Tanter, M., and Charpak, S. (2017). Light controls cerebral blood flow in naive animals. *Nat. Commun.* *8*, 14191.
- Säfholm, J., Dahlén, S.E., Delin, I., Maxey, K., Stark, K., Cardell, L.O., and Adner, M. (2013a). PGE₂ maintains the tone of the guinea pig trachea through a balance between activation of contractile EP1 receptors and relaxant EP2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* *168*, 794–806.
- Säfholm, J., Dahlén, S.E., and Adner, M. (2013b). Antagonising EP1 and EP2 receptors reveal that the TP receptor mediates a component of antigen-induced contraction of the guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* *718*, 277–282.
- Sagher, O., Zhang, X.-Q., Szeto, W., Thai, Q.A., Jin, Y., Kassell, N.F., and Lee, K.S. (1993). Live computerized videomicroscopy of cerebral microvessels in brain slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *13*, 676–682.
- Schain, A.J., Melo-carrillo, A., Strassman, A.M., Burstein, R., Schain, X.A.J., Melo-carrillo, A., Strassman, A.M., and Burstein, X. (2017). Cortical spreading depression closes paravascular space and impairs glymphatic flow: Implications for migraine headache. *J. Neurosci.* *37*, 2904–2915.
- Scott, N.A., and Murphy, T.H. (2012). Hemodynamic responses evoked by neuronal stimulation via channelrhodopsin-2 can be independent of intracortical glutamatergic synaptic transmission. *PLoS One* *7*, 1–10.
- Sharif, N.A., and Klimko, P.G. (2019). Prostaglandin FP receptor antagonists: discovery, pharmacological characterization and therapeutic utility. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 1059–1078.
- Slanina, K.A., and Schweitzer, P. (2005). Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated

decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology* 49, 653–659.

Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., and Isakson, P.C. (1998). Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13313–13318.

Sun, X., Li, P., Luo, W., Chen, S., Feng, N., Wang, J., and Luo, Q. (2010). Investigating the effects of dimethylsulfoxide on hemodynamics during cortical spreading depression by combining laser speckle imaging with optical intrinsic signal imaging. *Lasers Surg. Med.* 42, 809–815.

Tammaro, P., Smith, A.L., Hutchings, S.R., and Smirnov, S. V. (2004). Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 143, 303–317.

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N.T., Kim, T.K.T.T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B.B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., et al. (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat. Neurosci. advance on*, 1–37.

Thévenaz, P., Ruttimann, U.E., and Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41.

Uhlirova, H., Kılıç, K., Tian, P., Thunemann, M., Desjardins, M., Saisan, P.A., Sakadžić, S., Ness, T. V., Mateo, C., Cheng, Q., et al. (2016). Cell type specificity of neurovascular coupling in cerebral cortex. *Elife* 5, 1–23.

Vysniauskiene, I., Allemann, R., Flammer, J., and Haefliger, I.O. (2006). Vasoactive responses of U46619, PGF2 α , latanoprost, and travoprost in isolated porcine ciliary arteries. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 295–298.

Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9, 816–823.

Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., et al. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* (80-.). 347, 1138–1142.

Zhou, N., Gordon, G.R.J., Feighan, D., and MacVicar, B.A. (2010). Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cereb. Cortex* 20, 2614–2624.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50.

Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp

Gabrielle Devienne*, Benjamin Le Gac*, Juliette Piquet* & Bruno Cauli

*Contribution de manière égale

Article publié dans *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*

La RT-PCR sur cellule unique (« single-cell RT-PCR » ou scRT-PCR) (Lambolez et al., 1992) couramment utilisée au laboratoire combine une approche électrophysiologique et moléculaire sur une seule cellule. Brièvement, la scRT-PCR consiste à enregistrer une cellule par patch-clamp et à aspirer son cytoplasme afin de réaliser une transcription inverse sur ce contenu cytoplasmique. On détecte ensuite les ADN complémentaires d'un ensemble prédéfini d'une dizaine de gènes par PCR en multiplex. On peut compléter cette méthode par une caractérisation morphologique de la cellule grâce à l'ajout d'un traceur dans la pipette de patch. La scRT-PCR est réalisable sur les neurones (Lacroix et al., 2015; Piquet et al., 2018) ou sur les astrocytes (Blomstrand et al., 2004; Lacroix et al., 2015).

Cet article détaille les recommandations, le matériel nécessaire et la préparation des amorces et des réactifs à prévoir avant de réaliser la technique de RT-PCR sur cellule unique. Il est ensuite décrit le protocole avec l'ensemble des étapes pour accomplir cette technique et détecter les gènes d'intérêt que l'on souhaite dans le(s) type(s) cellulaire(s) sélectionné(s). La technique est illustrée par un exemple de caractérisation de sous-unités de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase de neurones pyramidaux de la couche V. Les avantages et les limitations de cette technique sont ensuite discutés.

L'article est accompagné d'une vidéo descriptive sur le site du *Journal of Visualized Experiments* : <https://www.jove.com/v/57627/single-cell-multiplex-reverse-transcription-polymerase-chain-reaction>

Cette technique de RT-PCR sur cellule unique a d'ailleurs fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe « Réseaux de neurones et rythmes physiopathologiques » de Régis Lambert et Nathalie Leresche dans le laboratoire Neurosciences Paris Seine à Paris et qui est présentée en annexe de ce manuscrit.

Video Article

Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp

Gabrielle Devienne^{*1}, Benjamin Le Gac^{*1}, Juliette Piquet^{*1}, Bruno Cauli¹¹UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Sorbonne Université^{*}These authors contributed equallyCorrespondence to: Bruno Cauli at bruno.cauli@upmc.frURL: <https://www.jove.com/video/57627>DOI: [doi:10.3791/57627](https://doi.org/10.3791/57627)

Keywords: Neuroscience, Issue 136, Gene expression profile, neurons, astrocytes, brain slices, whole-cell configuration, nested polymerase chain reaction (PCR)

Date Published: 6/20/2018

Citation: Devienne, G., Le Gac, B., Piquet, J., Cauli, B. Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *J. Vis. Exp.* (136), e57627, doi:10.3791/57627 (2018).

Abstract

The cerebral cortex is composed of numerous cell types exhibiting various morphological, physiological, and molecular features. This diversity hampers easy identification and characterization of these cell types, prerequisites to study their specific functions. This article describes the multiplex single cell reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) protocol, which allows, after patch-clamp recording in slices, to detect simultaneously the expression of tens of genes in a single cell. This simple method can be implemented with morphological characterization and is widely applicable to determine the phenotypic traits of various cell types and their particular cellular environment, such as in the vicinity of blood vessels. The principle of this protocol is to record a cell with the patch-clamp technique, to harvest and reverse transcribe its cytoplasmic content, and to detect qualitatively the expression of a predefined set of genes by multiplex PCR. It requires a careful design of PCR primers and intracellular patch-clamp solution compatible with RT-PCR. To ensure a selective and reliable transcript detection, this technique also requires appropriate controls from cytoplasm harvesting to amplification steps. Although precautions discussed here must be strictly followed, virtually any electrophysiological laboratory can use the multiplex single cell RT-PCR technique.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/57627/>

Introduction

The cerebral cortex comprises numerous cell types involved in various physiological processes. Their identification and characterization, a prerequisite to the understanding of their specific functions, can be very challenging given the large morphological, physiological, and molecular diversity that characterizes cortical cell types^{1,2,3,4}.

Single-cell multiplex RT-PCR is based on the combination of patch-clamp and RT-PCR techniques. It can probe simultaneously the expression of more than 30 predefined genes in electrophysiologically identified cells⁵. The inclusion of a neuronal tracer in the recording pipette further allows the morphological characterization of the recorded cells after histochemical revelation^{6,7,8,9,10}. It is a very useful technique for the classification of neuronal types based on multivariate analysis of their phenotypic traits^{5,9,10,11,12,13,14}. Single cell multiplex RT-PCR is also suited to the characterization of non-neuronal cells such as astrocytes^{15,16,17}, and can be virtually applied to every brain structure^{18,19,20,21,22,23} and cell type, assuming they can be recorded in whole-cell configuration.

This technique is very convenient for the identification of cellular sources and/or targets of transmission systems^{7,8,15,16,20,21,24,25,26,27,28}, especially when specific antibodies are lacking. It relies on patch-clamp recordings from visually identified cells²⁹, and thus also allows the targeting of cells in a specific cellular environment^{8,15,16}. Furthermore since the cytoarchitecture of brain tissue is preserved in brain slices, this approach also enables study of the anatomical relationships of the characterized cells with neuronal and non-neuronal elements^{7,8,18}.

Since this technique is limited by the amount of harvested cytoplasm and by the efficiency of the RT, the detection of mRNA expressed at low copy number can be difficult. Although other approaches based on RNAseq technology allow to analyze the whole transcriptome of single cells^{3,4,30,31}, they need high-throughput expensive sequencers not necessarily available to every laboratory. Since the single cell multiplex RT-PCR technique uses end-point PCR, it only requires widely available thermocyclers. It can be easily developed in laboratories equipped with electrophysiological set-ups and does not require expensive equipment. It can provide, within one day, a qualitative analysis of the expression of a predefined set of genes. Thus, this approach offers an easy access to the molecular characterization of single cells in a rapid manner.

Protocol

All experimental procedures using animals were performed in strict accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and conformed to the ethical guidelines of both the European Economic Community (86/609/EEC) and the French National Charter on the ethics of animal experimentation. All protocols were approved by the Charles Darwin ethics committee and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approval 2015 061011367540). The IBPS animal facility is accredited by the French authorities (A75-05-24).

1. Preliminary Considerations

Note: To avoid contaminations, conform to the following recommendations before undertaking single cell RT-PCR after patch-clamp.

1. Do not use plasmids containing genes of interest in the laboratory as they are a potential source of contamination.
2. Reserve a lab bench away from the gel electrophoresis room to prepare PCRs.
3. Dedicate a set of pipettes and aerosol resistant filter tips to manipulate DNA and RNA at concentrations lower than 1 ng/μL. Never use these to analyze PCR products.
4. Always use RNase- and DNase-free products and wear gloves.
5. Use dedicated chemicals for preparing internal patch-clamp solutions. Never use a spatula but rather weighing paper to weigh powders.
6. Use a dedicated pH electrode and pH standard solutions, as they can be a source of contamination (e.g., RNase).
7. Store borosilicate glass capillaries; 20 μL long, fine and flexible tips; a 20 μL micropipette; a home-made expeller (patch-clamp pipette holder attached to a 10 mL syringe); 500 μL PCR tubes; 10 μL aerosol resistant filter tips; and thin permanent markers in a dedicated box (**Figure 1**).

2. Primer Design

Note: Multiplex RT-PCR relies on two amplification steps. During the first PCR, all the genes of interest are co-amplified by mixing together all PCR primers. To detect reliably transcripts from single cells, it is essential to design efficient and selective PCR primers. The use of nested (internal) primers for the second rounds of PCR improves both the specificity and the efficiency of the amplification.

1. Retrieve the curated mRNA sequences of the genes of interest in NCBI Reference Sequence Database³² as well as those of their related family (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).
 1. Enter the name of the gene(s) and the species of interest as a query and click on the retrieved relevant sequence.
 2. To restrict the analysis to the coding sequence of the gene(s), click on **Send to** (upper right corner), and select **Coding sequences** and **FASTA Nucleotide** as format. Then click on **Create File** and save the FASTA sequence using a ".nt" file extension.
2. Use MACAW software³³ (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench) or any other multiple alignment software to determine the regions of homology.
 1. Click on **File | New Project...** and select **DNA** as the sequence type. To import the gene sequences, select **Sequence | Import Sequence...** and load a ".nt" file. Repeat the procedure for all related sequences.
 2. Click and drag all sequences in the **Schematic** window to select the entire sequences.
 3. Search the regions of homology by selecting **Alignment | Search for Blocks...** (CTRL+S). Select **Segment pair overlap** in **Search Method**. Adjust the **Pairwise score cutoff** to a relatively high value (e.g., 1,000) and the **Min. seqs. per block** to the total number of sequences to align and click on **Begin**.
 4. In the appearing **Search Result** window, select the result(s) with the highest MP-score and click on **Link**. If no result is found, decrease the **Pairwise score cutoff** and/or the **Min. seqs. per block**.
 5. To facilitate the visualization of homologous regions, select **Alignment | Shading | Mean score**.
 6. Select unlinked parts of the sequences and repeat the steps 2.2.3–2.2.4 to potentially determine other regions of homology with a lower MP-score.
 7. To obtain the most specific primers, select the regions with the least sequence homology.
3. Fetch the sequences of all splice variants and repeat steps 2.2.1–2.2.6. Select their common regions for an overall detection. Consider alternative cassettes for dedicated splice variants analyses^{20,34,35,36}.
4. Align the mRNA sequences on the animal model genome using BLAST³⁷ genomes (Basic Local Alignment Search Tool) to determine the intron-exon structure of the genes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 1. Select the BLAST mouse genome by clicking on **Mouse** and upload the retrieved FASTA sequence in the **Enter Query Sequence** section. In the **Program Selection**, select **Optimize for Highly similar sequences (megablast)**, then click on the **BLAST** button.
 2. In the **Descriptions** section, select the alignment with the highest Identity (up to 100%). Make sure that it corresponds to the gene of interest as indicated in **features** of the **Alignments** section.
 3. Sort the alignment by **Query start position** in the same section to obtain the exons succession of the coding sequence. Note the start and end positions of all hits which roughly correspond to the position of the introns on the query sequence (**Figure 2A**).
5. Select two different exons for the sense and antisense primers to differentiate easily cDNA from genomic DNA (gDNA) amplification based on a size criterion (**Figure 2**).

Note: The amplification of gDNA can occur at a low frequency when the nucleus is harvested with the cytoplasm. Thus, it is essential to design intron overspanning primer pairs (**Figure 2A**). In case of intron-less genes, the collection of the nucleus is problematic as it can lead to potentially confounding results. To address this issue, include a set of primers aimed at amplifying an intronic sequence to probe for the presence of gDNA²⁵. If the genomic control is positive, the results for all intron-less genes must be discarded.

6. To achieve an efficient amplification, select primers generating amplicons with a length ideally comprised between 200 and 400 base pairs (**Figure 2**).
7. To amplify simultaneously various cDNAs during the multiplex PCR step, design primers with a length between 18 and 24 nucleotides and a melting temperature (T_m) between 55 and 60 °C.
8. To minimize the formation of secondary structures, which reduce the amplification yield, select sense and anti-sense primers with minimal hairpin and duplex lengths (**Figure 2B**).
9. Design internal primers using the same criteria (steps 2.5–2.8).
10. Verify the specificity of the PCR primers by aligning the primers on the Reference RNA Sequence Database of the organism of interest using a nucleotide BLAST.
 1. In BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), click on **nucleotide BLAST**. Paste the sequence of a primer in the **Enter Query Sequence**.
 2. In the **Choose Search Set** section, click on **Others (nr etc.)**, select **Reference RNA sequences (refseq_rna)** in the **Database** option and specify the organism (e.g., *Mus musculus* (taxid:10090)) to restrict the analysis to the desired species.
 3. In **Program Selection** select **Optimize for Somewhat similar sequences (blastn)**. In the **Algorithm parameters** section reduce the **word size** down to 7 to increase the chance to obtain hits.
11. To design selective primers, keep only those whose sequence has at least 3 mismatches with undesired cDNAs when possible.
12. Order desalted primers at a relatively high concentration (e.g., 200 μM) to ensure that all external primers can be mixed together at a final concentration of 1 μM .

3. Preparation of RT Reagents

1. 5x RT-mix: Prepare in RNase-free water 400 μL of working RT mix solution (5x) containing random primers at 25 μM and dNTPs at 2.5 mM each. Store this working mix as 20 μL aliquots in 500 μL tubes.
2. 20x Dithiothreitol (DTT): Prepare 1 mL of 0.2 M DTT in RNase-free water and store it as 50 μL aliquots.
3. Store 2,500 U of RNase inhibitor (40 U/ μL) and 10,000 U of reverse transcriptase (RTase, 200 U/ μL) as 5 μL aliquots.
4. To ensure an optimal quality of the RT reagents, store the aliquots at -80 °C. Use them for up to 10 cells and only for one day.

4. PCR Validation

1. Prepare cDNAs by doing a reverse transcription on a relatively large amount of total RNA (typically 1 μg) extracted³⁸ from the structure of interest.
 1. Do not use the pipettes dedicated to single cell RT-PCR for these preliminary steps but use the RNase-free pipettes. Dilute total RNA down to 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
 2. In a 500 μL PCR tube, add 1 μL of diluted total RNA and 8 μL of RNase-free water. Denature at 95 °C for 1 min and cool down the tube on ice.
 3. Add 4 μL of RT 5x buffer supplied by the manufacturer, 4 μL of RT mix solution, 1 μL of RTase, 1 μL of RNase inhibitor, and 1 μL of 200 mM DTT (see Section 3).
 4. Flick the tube, spin it, and incubate overnight at 37 °C.
 5. Store the cDNAs at -80 °C for up to several years. Prepare an aliquot of cDNAs diluted to 1 ng/ μL of total RNAs equivalents.
 2. Mix and dilute each primer pair at 1 μM with the pipettes dedicated to single cell RT-PCR. Use 20 μL of each primer mix for 100 μL PCRs.
 3. On ice, prepare for each primer pair a premix containing: water (q.s., 80 μL), 10 μL of 10X buffer, 1 μL of 100x dNTPs (50 μM each), 500–1,000 pg of cDNA diluted at 1 ng/ μL , and 0.5 μL (2.5 U, 5 U/ μL) of Taq polymerase.
 4. Use PCR tubes that tightly fit the wells of the PCR machine for an optimal temperature control. Add 2 drops (~100 μL) of mineral oil to the premix without touching the wall or the cap of the PCR tube.
 5. To minimize the formation of primer-dimers, perform a hot start by placing the PCR tubes in the thermocycler pre-heated at 95 °C. After 30 s, quickly expel 20 μL of the primer mix on top of the oil.
 6. After 3 min at 95 °C, run 40 cycles (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 35 s) followed by a final elongation step at 72 °C for 5 min.
 7. Analyze 10 μL of each PCR products by agarose gel electrophoresis (2%, weight/volume)³⁹. If some PCR products do not have the expected size, re-design other primers (see Section 2).
- Caution: Ethidium bromide is an intercalating chemical that can induce DNA mutations. Consult the local safety office before using it. Always wear gloves when manipulating it. Use a commercially available solution of ethidium bromide (10 mg/mL) solution instead of powder to minimize the risk of inhalation. Similarly, UV light can be harmful, so make sure to wear UV protection safety glasses or a mask. Withdraw soiled gels, tips, gloves, and buffer in containers dedicated to ethidium waste.
8. Once all primer pairs have been individually validated, test the multiplex protocol (**Figure 3**).
 1. Mix and dilute all external primers together at 1 μM . Store the multiplex primers mix at -20 °C for up to several weeks.
 2. On ice, prepare a premix containing: water (q.s., 80 μL), 10 μL of 10X buffer, 1 μL of 100x dNTPs (50 μM of each), 500–1,000 pg of cDNAs diluted at 1 ng/ μL , and 0.5 μL (2.5 U, 5 U/ μL) of Taq polymerase.
 3. Flick the PCR tube, spin it, and add two drops (~100 μL) of mineral oil.
 4. Perform a hot start as described in step 4.5 with 20 μL of multiplex primer mix. After 3 min at 95 °C, run 20 PCR cycles identical to those of step 4.6.
 5. Prepare a number of PCR tubes identical to the number of genes to analyze. Prepare a premix as in step 4.8.2, but using 1 μL of the first PCR product per gene as template. Adjust all the volumes according to the number of genes to analyze and consider using 10% of extra volume to compensate for pipetting errors.
 6. Shake gently, spin the tube, dispatch 80 μL of premix in each PCR tube, and add two drops (~100 μL) of mineral oil per tube without touching the wall or the cap of the tubes.
 7. Perform a hot start (see step 4.5) by expelling 20 μL of internal primer mix prepared in step 4.2. Run 35 PCR cycles identical to step 4.6.

- Analyze the second PCR products by agarose gel electrophoresis. Make sure that every second PCR generates an amplicon of the expected size. In case of inefficient or nonspecific amplifications, re-design new primers (steps 2.5–2.12) and validate them (steps 4.2–4.8).

5. Preparation and Validation of Intracellular Patch-clamp Solution

Note: The following protocol describes the preparation and validation of a K⁺/gluconate based internal solution, but virtually any type of patch-clamp solution can be used as long as it does not hamper the efficiency of the RT-PCR. Wearing gloves is mandatory to obtain an RNase-free internal solution.

- For 60 mL of internal patch-clamp recording solution, prepare extemporaneously 10 mL of 0.1 M KOH.
- Dissolve 11.4 mg of EGTA (0.5 mM final) in 0.9 mL of 0.1 M KOH.
- Add 40 mL RNase-free water and dissolve 2.02 g of K-gluconate (144 mM final), 143 mg of HEPES (10 mM final), and 180 μ L of 1 M MgCl₂ (3 mM final).
- Adjust the pH to 7.2 by adding ~6 mL of 0.1 M KOH.
- Adjust the osmolarity to 295 mOsm with ~13 mL of RNase-free water.
- Since the internal solution is also used as a buffer for the reverse transcription, carefully control Mg²⁺ concentration. Compensate for a lower Mg²⁺ concentration in the internal solution by adding MgCl₂ afterwards to reach a final concentration of 2 mM in the RT reaction.
- To label the harvested cell after patch-clamp recording, add 2–5 mg/mL of RNase-free biocytin to the internal solution described above (steps 5.1–5.5).
- Filter (0.22 μ m pore size) the internal solution and store it at -80 °C as 100–250 μ L aliquots.
- To validate the use of the internal solution for single-cell RT-PCR, add 0.5 μ L of total RNAs diluted at 1 ng/ μ L to 6 μ L of patch-clamp solution and leave it on the bench for about 30 min.
- With a 2 μ L micropipette, add 2 μ L of 5x RT-mix, 0.5 μ L of 20x DDT, 0.5 μ L RNase inhibitor, and 0.5 μ L RTase, and incubate overnight at 37 °C.
- Spin the tube. On ice add water (*q.s.*, 80 μ L), 10 μ L of 10X buffer, and 0.5 μ L (2.5 U, 5 U/ μ L) of Taq polymerase.
- Perform 40 cycles of PCR using a set of validated primers (steps 4.4–4.6).
- Analyze the PCR products by agarose gel electrophoresis (see step 4.7) and verify that they have the expected size.
Note: Omitting the 0.5 μ L of total RNA and replacing it with 0.5 μ L RNase-free water will ensure that the internal solution is free of RNA and/or DNA contaminations.

6. Acute Slice Preparation

Note: This protocol describes the slicing procedure for juvenile (*i.e.*, less than 28 postnatal days) male and female mice. Other cutting solutions, such as sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (aCSF) are also usable⁴⁰.

- Prepare 2 L of aCSF containing (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, and 15 Sucrose. To reduce glutamatergic activity during slice preparation, prepare a cutting solution by adding 1 mM of kynurenic acid.
- Before slicing, prepare a dissection kit containing surgical scissors, fine iris scissors, two spatulas, forceps, a disc of paper filter, and cyanoacrylate glue.
- Use ice-cold cutting solution saturated with O₂/CO₂ (95%/5%) and cool down the cutting chamber at -20 °C.
- Anesthetize the mouse with a small paper towel soaked with isoflurane. After ~2 min, make sure that the mouse is under deep anesthesia by verifying the absence of response to paw pinch.
- Quickly decapitate the mouse. Remove the scalp and open the skull. Extract the brain carefully and place it into a small beaker filled with ice cold (~4 °C) cutting solution oxygenated with O₂/CO₂.
- Remove the cutting chamber from -20 °C conditions and remove moisture with a paper towel.
- Carefully dissect the brain to isolate the region of interest, glue it on the cutting chamber, and add ice-cold cutting solution oxygenated with O₂/CO₂.
- Cut 300 μ m thick slices using a vibratome. Transfer them at room temperature in a resting chamber filled with oxygenated cutting solution and allow them to recover for at least 0.5 h.

7. Single Cell RT-PCR after Patch-clamp Recording

- Clean the perfusion system regularly with ~100 mL of 30% H₂O₂ solution and rinse extensively with ~500 mL of distilled water to avoid bacteria growth, as it is an overlooked source of RNase contamination.
- Chlorinate the filament with a patch pipette filled with concentrated bleach every harvesting day. Do not use a micropipette to fill the patch pipette but rather a 20 μ L long, fine, flexible tip attached to a 1 mL syringe. Then, rinse it extensively with RNase free water and dry it with a gas duster.
- Prepare a small box of ice containing 5x RT-mix and 20x DTT aliquots. Store the RTase and RNase inhibitor aliquots at -20 °C in a benchtop cooler.
- Transfer a slice into the recording chamber perfused at 1–2 mL/min with oxygenated aCSF.
- Pull patch pipettes (1–2 μ m open tip diameter, 3–5 M Ω) from borosilicate glass while wearing gloves and fill one of them with 8 μ L of internal solution. Keep in mind that the knobs of the pipette puller are a source of RNase contamination.
- Place the pipette in the pipette holder while wearing new gloves and not touching the filament with fingers.
- Approach the patch pipette with a positive pressure and perform whole-cell recording to characterize the targeted cell (**Figure 4**).
- In order to preserve the mRNAs, limit the time in whole-cell configuration to 20 min⁴¹.
- At the end of the recording, prepare a 500 μ L PCR tube filled with 2 μ L of 5x RT Mix and 0.5 μ L of 20x DTT, spin it, and store it on ice.

10. Harvest the cell cytoplasm by applying a gentle negative pressure (**Figure 4**). Visually control that the cell's content comes inside the pipette while maintaining a tight seal.
 1. Avoid as much as possible collecting the nucleus if some intron-less genes are considered. In such a case always include a set of primers aimed at amplifying gDNA to probe for genomic contamination.
 2. If the nucleus is coming close to the tip of the pipette, release the negative pressure and move the pipette away from the nucleus. Ensure that the tight seal is preserved and restart to collect the cytoplasm at the new pipette location.
11. Stop the harvesting when no more material is coming and/or before losing the tight seal.
12. Withdraw the pipette gently to form an outside-out patch to limit contamination by the extracellular debris (**Figure 4**) and to favor the closure of the cell membrane for subsequent histochemical analysis.
13. Keep in mind that knobs, micromanipulators, computer keyboard, or computer mouse are potential sources of RNase contamination. If they have been touched during the recording, change gloves.
14. Attach the pipette to the expeller and expel its content into the PCR tube by applying a positive pressure (**Figure 1**).
15. Break the tip of the pipette into the PCR tube to help the collection of its content.
16. Briefly centrifuge the tube, add 0.5 μ L of RNase inhibitor and 0.5 μ L of RTase, mix gently, centrifuge again, and incubate overnight at 37 $^{\circ}$ C.
17. Spin the tube and store it at -80 $^{\circ}$ C for up to several months until PCR analysis.
18. Perform the first amplification step directly in the tube containing the \sim 10 μ L of RT products by adding water (*q.s.*, 80 μ L), 10 μ L of 10x buffer, and 0.5 μ L (2.5 U) of Taq polymerase. Then, follow the instructions described in steps 4.8.2–4.8.8.

8. Histochemical Staining of the Recorded Cell (Optional)

1. Following the electrophysiological recordings, maintain the slice for 20 min in oxygenated aCSF to allow the diffusion of biocytin in the axonal and dendritic tree.
2. Place the slice in a well of a 24-well plate and fix it overnight at 4 $^{\circ}$ C with 1 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer.
3. Wash the slices 4 times, 5 min each, with 1 mL Phosphate Buffered Saline (PBS).
4. In the same well, permeabilize and saturate the slice during 1 h at room temperature with 1 mL of PBS supplemented with 0.25% Triton X-100 and 0.2% gelatin from cold water fish skin (PBS-GT).
5. Incubate overnight with a fluorescently labeled avidin diluted at 1/400 in 250–500 μ L of PBS-GT.
6. Wash 5 times, 5 min each, with 1 mL of PBS and mount the slices.

Representative Results

A representative validation of multiplex RT-PCR is shown in **Figure 3**. The protocol was designed to probe simultaneously the expression of 12 different genes. The vesicular glutamate transporter vGluT1 was taken as a positive control for glutamatergic neurons⁴². The GABA synthesizing enzymes (GAD65 and GAD 67), Neuropeptide Y (NPY), and Somatostatin (SOM) were used as markers of GABAergic interneurons^{3,5,11}. The cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2) was used as a marker of the pyramidal cell sub-population^{3,16}.

The ATP1 α 1-3 subunits of the Na⁺/K⁺ ATPase and the Kir6.2 and SUR1 subunits of the ATP-sensitive K⁺ channels were chosen to evaluate the relationship between neuronal activity and metabolic states⁴³. Since Kir6.2 is an intron-less gene, the SOM intron was included as a genomic control. The protocol has been tested on 1 ng of reverse transcribed total RNA extracted from mouse whole brain, which corresponds approximately to the transcripts of 20 cells⁴⁴. The multiplex PCR produced 12 amplicons of the expected size (**Figure 3** and **Table 1**) demonstrating the sensitivity and efficiency of the protocol. The negative control performed without RNA produced no amplicon (data not shown).

A layer V pyramidal neuron was visually identified by its large soma and a prominent apical dendrite (**Figure 5A**, inset). Whole cell recording revealed typical electrophysiological properties of layer V regular spiking neurons^{5,45,46} with, notably, a low input resistance, long-lasting action potentials, and pronounced spike frequency adaptation (**Figure 5A**). The molecular analysis of this neuron revealed the expression of vGluT1 (**Figure 5B**), confirming its glutamatergic phenotype^{42,46}. This neuron also expressed SOM, ATP1 α 1, and 3 subunits of the Na⁺/K⁺ ATPase. Biocytin labeling of the recorded neurons confirmed a pyramidal morphology (**Figure 5D**).

As expected from glutamatergic neurons, the molecular analysis of 26 layer V pyramidal cells revealed expression of vGluT1, but neither of the two GADs (**Figure 5C**). Markers of interneurons were rarely observed^{5,42,46}. COX-2, chiefly expressed by layer II-III pyramidal cells^{3,16}, was not detected in layer V pyramidal cells. The ATP1 α 1 and 3 subunits were more frequently observed than the ATP1 α 2 subunit³. The Kir6.2 and SUR1 subunits were rarely detected in layer V pyramidal neurons, which is consistent with their preferential expression in upper layers^{3,43}. Care was taken not to harvest the nuclei, resulting in a rare detection of SOM introns (3 out of 26 cells, *i.e.*, 12%).

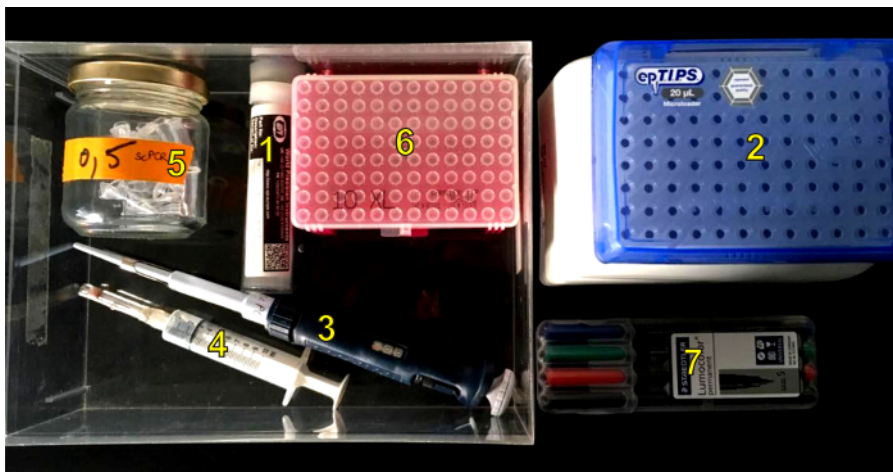


Figure 1: Dedicated box for single cell RT-PCR. List of materials reserved for RT-PCR after patch-clamp. (1) Borosilicate glass capillaries, (2) 20 µL long, fine, flexible tips, (3) 20 µL micropipette, (4) home-made expeller, (5) 500 µL PCR tubes, (6) 10 µL aerosol resistant filter tips, and (7) permanent markers. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

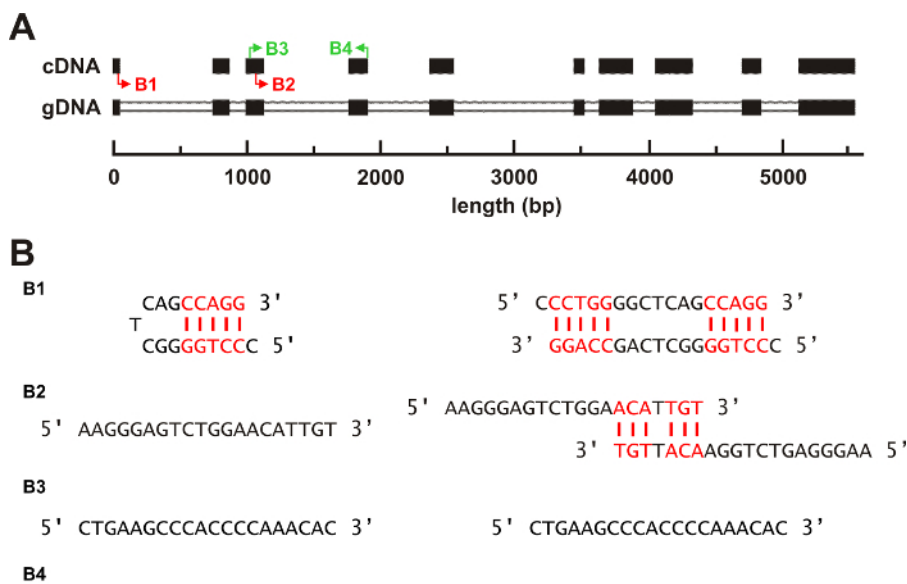


Figure 2: PCR primer design strategy. (A) Schematic representation of the coding sequence of COX 2 cDNA aligned to the mouse chromosome 2 sequence containing the COX 2 gene. Exons are represented by black boxes and introns on gDNA by white boxes. Note the gaps in the cDNA corresponding to the intronic sequences on gDNA. Representative examples of bad and good oligonucleotides represented as red and green arrows, respectively. Right and left arrows denote forward and reverse primers. (B) Sequences and secondary structures of the oligonucleotides shown in (A). Left and right panels indicate hairpin self-complementarity and self-dimer formation, respectively. The **B1** oligonucleotide displays both a strong hairpin self-complementarity and dimer formation whereas the **B2** oligonucleotide only shows dimer formation. Both **B3** and **B4** oligonucleotides have no hairpin self-complementarity and no dimer formation; they are intron overspanning (A) and have been selected as potential PCR primers (see **Table 1**). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

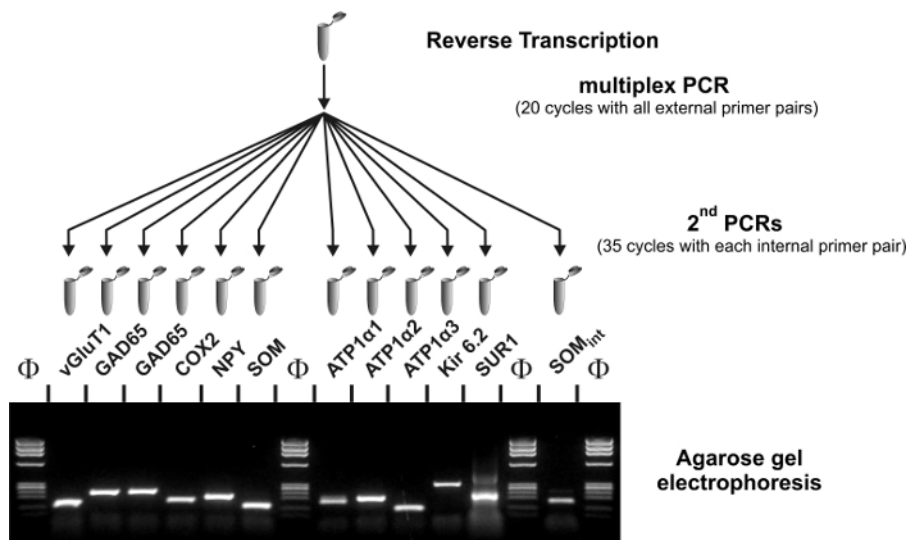


Figure 3: Validation of multiplex PCR. 1 ng of total RNA from mouse whole brain was subjected to a reverse transcription followed by two rounds of PCR amplification. The 12 PCR products were resolved in separate lanes by agarose gel electrophoresis in parallel with Φ x174 digested by *Hae*III. The second PCR products had sizes (in bp) predicted by the sequences: 153 (vGluT1), 248 (GAD65), 255 (GAD67), 181 (COX 2), 220 (NPY), 146 (SOM), 183 (ATP1a1), 213 (ATP1a2), 128 (ATP1a3), 342 (Kir6.2), 211 (SUR1), and 182 (SOM_{int}). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

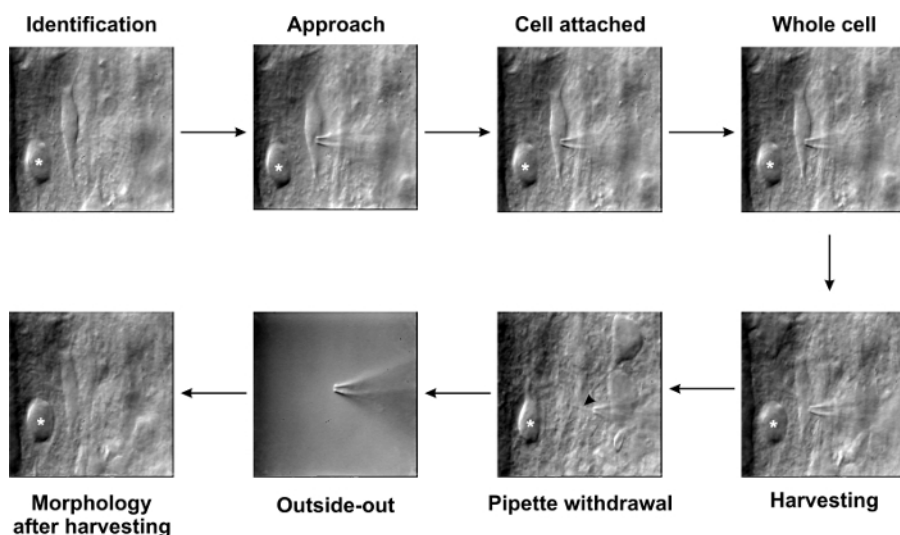


Figure 4: Patch-clamp harvesting in brain slices. Once a cell is visually identified, the recording pipette is approached with a positive pressure in order to avoid cellular debris contamination at the tip of the pipette. Note the dimple on the membrane of this neuron. Positive pressure is then interrupted in order to form a cell-attached configuration with a Gigaohm tight seal. Brief suction is applied to switch to whole-cell configuration. At the end of the recording, the cytoplasm is harvested by applying a gentle negative pressure into the pipette while maintaining the tight seal. Note the shrinkage of the cell body during the harvesting procedure. The recording pipette is then gently withdrawn to form an outside-out patch, which favors cell membrane closure for subsequent biocytin revelation, and preservation of harvested material in the patch pipette. Reproduced from Cauli and Lambolez⁴⁷ with permission from the Royal Society of Chemistry. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

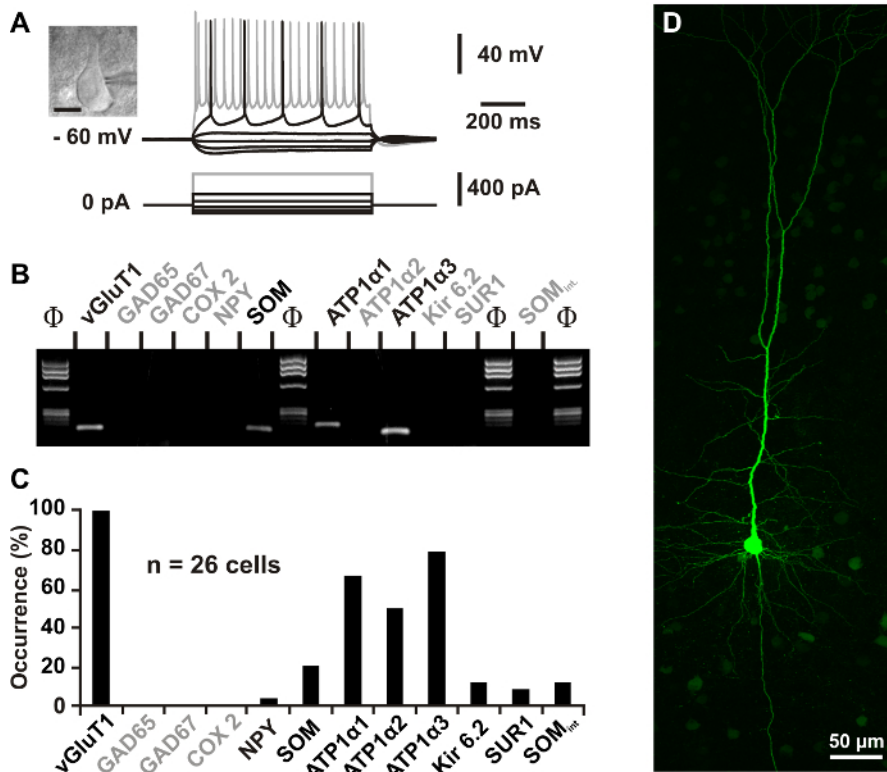


Figure 5: Characterization of layer V neocortical pyramidal cells. (A) Membrane potential response of a layer V pyramidal cell induced by current pulses of -100, -40, -10, +60, +120, and +500 pA (bottom traces). The neuron displays a weak potential deflection after the initial hyperpolarizing response (upper traces). In response to a supraliminal depolarization, the neuron discharged long-lasting action potentials with slowly developing after-hyperpolarization (upper trace). Near saturation, the neuron discharged at a low frequency and exhibited a pronounced adaptation (upper gray trace). **Inset:** infrared pictures of the recorded layer V pyramidal neuron. The pial surface is upward. Scale bar: 20 μ m. (B) Multiplex RT-PCR analysis revealing expression of vGluT1, SOM, ATP1 α 1, and ATP1 α 3. (C) Gene expression profile in a sample of 26 layer V pyramidal cells. vGluT1 was expressed in all neurons while GAD65, GAD67, and COX2 were never detected. NPY, SOM, Kir6.2, SUR1, and SOM_{int} were rarely observed. Pyramidal cells expressed ATP1 α 3, 1 subunit of the Na⁺/K⁺ ATPase, and ATP1 α 2 to a lesser extent. (D) Maximum intensity projection of confocal images showing biocytin labeling of the neuron recorded in (A). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Gene / GenBank number	External primers	Size (bp)	Internal primers	Size (bp)
vGlut1 NM_182993	Sense, -113	259	Sense, -54	153
	GGCTCCTTTTTCTGGGGCTAC		ATTCGCAGCCAACAGGGTCT	
	Anti-sense, 126		Anti-sense, 79	
	CCAGCCGACTCCGTCTAAG		TGGCAAGCAGGGTATGTGAC	
GAD65 NM_008078	Sense, 99	375	Sense, 219	248
	CCAAAAGTTCACGGGCGG		CACCTGCGACCAAAAACCCT	
	Anti-sense, 454		Anti-sense, 447	
	TCCTCCAGATTTTGC GGTTG		GATTTTGC GGTTGGTCTGCC	
GAD67 NM_008077	Sense, 529	598	Sense, 801	255
	TACGGGGTTCGCACAGGTC		CCCAGAAGTGAAGACAAAAGGC	
	Anti-sense, 1109		Anti-sense, 1034	
	CCCAGGCAGCATCCACAT		AATGCTCCGTAAACAGTCGTGC	
COX 2 NM_011198	Sense, 199	268	Sense, 265	181
	CTGAAGCCCACCCAAACAC		AACAACATCCCCTTCTCTGCG	
	Anti-sense, 445		Anti-sense, 426	
	CCTTATTTCCCTTCACACCCAT		TGGGAGTTGGGCAGTCATCT	
NPY NM_023456	Sense, 16	294	Sense, 38	220
	CGAATGGGGCTGTGTGGA		CCCTCGCTCTATCTCTGCTCGT	
	Anti-sense, 286		Anti-sense, 236	
	AAGTTTCATTTCCCATCACCACAT		GCGTTTTCTGTGCTTTCCTTCA	
SOM NM_009215	Sense, 43	208	Sense, 75	146
	ATCGTCCTGGCTTTGGGC		GCCCTCGGACCCAGACT	
	Anti-sense, 231		Anti-sense, 203	
	GCCTCATCTCGTCTGCTCA		GCAAATCCTCGGGCTCCA	
ATP1α1 NM_144900	Sense, 1287	288	Sense, 1329	183
	CAGGGCAGTGTTTCAGGCTAA		TAAGCGGGCAGTAGCGGG	
	Anti-sense, 1556		Anti-sense, 1492	
	CCGTGGAGAAGGATGGAGC		AGGTGTTTGGGCTCAGATGC	
ATP1α2 NM_178405	Sense, 1392	268	Sense, 1430	213
	AGTGAGGAAGATGAGGGACAGG		AAATCCCCTTCAACTCCACCA	
	Anti-sense, 1640		Anti-sense, 1623	
	ACAGAAGCCCAGCACTCGTT		GTTCCCAAGTCTCCACAGC	
ATP1α3 NM_144921	Sense, 127	216	Sense, 158	128
	CGGAAATACAATACTGACTGCGTG		TGACACACAGTAAAGCCCAGGA	
	Anti-sense, 324		Anti-sense, 264	
	GTCATCTCCGTCCTGCC		CCACAGCAGGATAGAGAAGCCA	
Kir6.2 NM_010602	Sense, 306	431	Sense, 339	342
	CGGAGAGGGCACCAATGT		CATCCACTCCTTTTCATCTGCC	
	Anti-sense, 719		Anti-sense, 663	
	CACCCACGCCATTCTCCA		TCGGGGCTGGTGGTCTTG	
SUR1 NM_011510	Sense, 1867	385	Sense, 2041	211
	CAGTGTGCCCCCGAGAG		ATCATCGGAGGCTTCTTACC	
	Anti-sense, 2231		Anti-sense, 2231	
	GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG		GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG	

SOMint X51468	Sense, 8	240	Sense, 16	182
	CTGTCCCCCTTACGAATCCC		CTTACGAATCCCCAGCCTT	
	Anti-sense, 228		Anti-sense, 178	
	CCAGCACCAGGGATAGAGCC		TTGAAAGCCAGGGAGGAACT	

Table 1. Sequences of first and second PCR primers. The position of each PCR primer and their sequences are given from 5' to 3'. Except for the somatostatin intron, position 1 corresponds to the first base of the start codon of each gene.

Discussion

Single cell multiplex RT-PCR after patch-clamp can simultaneously and reliably probe the expression of more than 30 genes in electrophysiologically identified cells⁵. Analyzing gene expression at the single cell level requires highly efficient PCR primers. One of the most limiting steps is collection of the cell's content. Its efficiency depends on the diameter of the patch pipette tip, which must be as large as possible while matching the cell size. Pipettes with a 1-2 μm open tip diameter were proven to be suitable for most neuronal types. It is also essential to make sure that only the cellular content is collected, and not the surrounding tissue. This is achieved by controlling electrophysiologically the preservation of a tight seal during the harvest. The formation of an outside-out patch configuration during pipette withdrawal further protects the harvested cytoplasm from cellular debris. The success rate of the single cell multiplex RT-PCR also depends on mRNAs abundance of the investigated cell type. For instance, the yield obtained with astrocytes, which express mRNAs in relatively low amounts³, is generally lower than the one obtained with neurons and thus requires increasing sample size^{15,16}. Reverse transcription, which has a low efficiency in tubes⁴⁸, is the limiting reaction of single cell multiplex RT-PCR. It is therefore critical to use top quality reagents, to store them as aliquots at -80 °C, and to use them only for one day. Finally, the DNA polymerase activity of the RTase is often an overlooked source of primer-dimer formation. To address this issue, performing a hot start with primers is critical to increase the amplification efficiency. In addition this will reduce the inhibitory effect of RTase on the Taq DNA polymerase activity⁴⁹.

The single cell multiplex RT-PCR technique is highly versatile. It has been extensively used in rodents^{10,11,13,19,20,34,50,51,52,53,54} but can be adapted to virtually all animal models and genes assuming that tissue and gene sequences are available. Various patch-clamp solutions can be used as long as they do not interfere with the RT-PCR on cell free assays. For instance internal solutions based on K⁺ or Cs⁺ cations, Cl⁻ or gluconate have been successfully used^{6,36,41,55}.

Classical false negative results stem from RNase contamination of the patch pipette filament and/or internal patch-clamp solution. Carefully chlorinating the filament and validating the internal solution generally solve this problem. False negative results can also occur when a gene is expressed at a low single cell level, since only a proportion of the cytoplasm is harvested. The harvesting quality can be increased by using larger pipettes and/or by reducing the time of the whole-cell recording. Harvesting quality can be assessed by including a gene known to be expressed at a low level in single cells²⁰. False positive results can occur with bad tissue quality, in which the amount of contaminating cellular debris is high. Testing the presence of debris is done by inserting a patch pipette into the slice without performing any seal and releasing the positive pressure prior to the pipette removal. The presence of amplifiable materials is then probed by multiplex RT-PCR⁴². Silanizing the patch pipette has also been used to reduce the collection of extracellular contaminants⁵⁶. Single cell PCR is a very sensitive technique that can detect as little as a single copy of double stranded DNA⁵⁷. In the case of intron-less genes, the gDNA contained in the nucleus can also produce false positives. Avoiding the collection of gDNA by placing the pipette away from the nucleus during the harvesting helps to solve this issue. The presence of gDNA can be reliably probed by amplifying an intronic sequence²⁵.

The detection of mRNA molecules by RT-PCR becomes unreliable at 10 copies⁴⁴, presumably because of the low efficiency of the RTase⁴⁸, and can lead to an under detection of low-abundance transcripts^{26,42}. This can be problematic in the case of intron-less genes. Indeed, avoiding harvest of the nucleus reduces the amount of cytoplasm that can be collected and therefore the detection sensitivity. The combination of single-cell RT-PCR after patch-clamp with biocytin labeling requires that the shape of the cell is maintained as much as possible (**Figure 3**). Unavoidably, this reduces the amount of material that can be collected, thereby reducing the success rate. A compromise between cytoplasm collection and preservation of cell morphology is mandatory.

Multiplex single-cell RT-PCR data are not quantitative as they only give information on whether cDNAs are present or absent in the collected material. However, because of the detection limits described above, the occurrence of detection at the population level can reflect the abundance of genes at the single cell level. Alternative approaches allow the generation of more quantitative data, but the technical constraints imposed by their specific amplification strategies (*i.e.*, relative quantification of homologous genes or RT-qPCR) largely restrict the number of genes that can be simultaneously analyzed^{41,53,55,58,59,60,61,62,63,64,65,66}. The recent combination of patch-clamp recordings and single cell RNaseq, referred to as Patch-seq^{30,31}, allows quantitative transcriptomic analysis of electrophysiologically-characterized cells. It is a new and promising approach, yet it requires access to high-throughput sequencers and the data generated require time consuming analysis.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

We thank Dr. Alexandre Mouro for his comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011 MALZ 003 01; ANR-15-CE16-0010 and ANR-17-CE37-0010-03), BLG is supported by fellowship from the Fondation pour la Recherche sur Alzheimer. We thank the animal facility of the IBPS (Paris, France).

References

- Ascoli, G.A. *et al.* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.* **9** (7), 557-568, (2008).
- DeFelipe, J. *et al.* New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat.Rev.Neurosci.* (2013).
- Tasic, B. *et al.* Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat.Neurosci.* (2016).
- Zeisel, A. *et al.* Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* (2015).
- Cauli, B. *et al.* Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** (11), 6144-6149, (2000).
- Cauli, B. *et al.* Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J.Neurosci.* **17** (10), 3894-3906, (1997).
- Férézou, I. *et al.* 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* **22** (17), 7389-7397, (2002).
- Cauli, B. *et al.* Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J.Neurosci.* **24** (41), 8940-8949, (2004).
- Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C.Z., & Markram, H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb.Cortex.* **12** (4), 395-410, (2002).
- Wang, Y. *et al.* Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J.Physiol.* **561** (Pt 1), 65-90, (2004).
- Karagiannis, A. *et al.* Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J.Neurosci.* **29** (11), 3642-3659, (2009).
- Battaglia, D., Karagiannis, A., Gallopin, T., Gutch, H.W., & Cauli, B. Beyond the frontiers of neuronal types. *Front Neural Circuits.* **7** 13, (2013).
- Toledo-Rodriguez, M. *et al.* Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb.Cortex.* **14** (12), 1310-1327, (2004).
- Toledo-Rodriguez, M., Goodman, P., Illic, M., Wu, C., & Markram, H. Neuropeptide and calcium binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J.Physiol.* (2005).
- Leclux, C. *et al.* Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J.Neurosci.* **31** (27), 9836-9847, (2011).
- Lacroix, A. *et al.* COX-2-derived prostaglandin E₂ produced by pyramidal neurons contributes to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex. *J.Neurosci.* **35** (34), 11791-11810, (2015).
- Mathias, K. *et al.* Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J.Neurosci.* **23** (5), 1750-1758, (2003).
- Rancillac, A. *et al.* Glutamatergic control of microvascular tone by distinct gaba neurons in the cerebellum. *J.Neurosci.* **26** (26), 6997-7006, (2006).
- Miki, T. *et al.* ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat.Neurosci.* **4** (5), 507-512, (2001).
- Liss, B., Bruns, R., & Roeper, J. Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **18** (4), 833-846, (1999).
- Gallopin, T. *et al.* Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature.* **404** (6781), 992-995, (2000).
- Gallopin, T. *et al.* The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A_{2A} receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience.* **134** (4), 1377-1390, (2005).
- Fernandez, S.P. *et al.* Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain. *Brain Struct.Funct.* (2015).
- Porter, J.T. *et al.* Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J.Neurosci.* **19** (13), 5228-5235, (1999).
- Hill, E.L. *et al.* Functional CB₁ receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J.Neurophysiol.* **97** (4), 2580-2589, (2007).
- Férézou, I. *et al.* Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical interneurons. *Cereb.Cortex.* **17** (8), 1948-1957, (2007).
- Hu, E. *et al.* VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb.Cortex.* **21** (3), 708-718, (2011).
- Louessard, M. *et al.* Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol.Neurobiol.* (2015).
- Stuart, G.J., Dodt, H.U., & Sakmann, B. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch.* **423** (5-6), 511-8, (1993).
- Cadwell, C.R. *et al.* Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat.Biotechnol.* **34** (2), 199-203, (2016).
- Fuzik, J. *et al.* Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat.Biotechnol.* **34** (2), 175-183, (2016).
- O'Leary, N.A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* **44** (D1), D733-D745, (2016).
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., & Lipman, D.J. A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins.* **9** (3), 180-190, (1991).
- Ruano, D., Lambolez, B., Rossier, J., Paternain, A.V., & Lerma, J. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron.* **14** (5), 1009-1017, (1995).
- Porter, J.T. *et al.* Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur.J.Neurosci.* **10** (12), 3617-3628, (1998).
- Ruano, D., Perrais, D., Rossier, J., & Ropert, N. Expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs by layer V pyramidal cells of the rat primary visual cortex. *Eur.J.Neurosci.* **9** (4), 857-862, (1997).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215** (3), 403-410, (1990).

38. Chomczynski, P., & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162** (1), 156-9, (1987).
39. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., & Kim, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* (62), (2012).
40. Liss, B. *et al.* K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat. Neurosci.* **8** (12), 1742-1751, (2005).
41. Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crepel, F., & Rossier, J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron.* **9** (2), 247-258, (1992).
42. Gallopin, T., Geoffroy, H., Rossier, J., & Lambolez, B. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex.* **16** (10), 1440-1452, (2006).
43. Cunningham, M.O. *et al.* Neuronal metabolism governs cortical network response state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (14), 5597-5601, (2006).
44. Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., & Ozawa, S. Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **77** (6), 1650-1659, (2001).
45. McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., & Prince, D.A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of Neurophysiology.* **54** (4), 782-806, (1985).
46. Andjelic, S. *et al.* Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J. Neurophysiol.* **101** (2), 641-654, (2009).
47. Cauli, B., & Lambolez, B. In: *Unravelling Single Cell Genomics: Micro and Nanotools.* RSC Nanoscience and Nanotechnology. Bontoux, N., & Potier, M.C. eds., Ch. 9, RSC publishing, Cambridge, 81-92 (2010).
48. Bontoux, N. *et al.* Integrating whole transcriptome assays on a lab-on-a-chip for single cell gene profiling. *Lab Chip.* **8** (3), 443-450 (2008).
49. Sellner, L.N., Coelen, R.J., & Mackenzie, J.S. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* **20** (7), 1487-1490, (1992).
50. Perrenoud, Q., Rossier, J., Geoffroy, H., Vitalis, T., & Gallopin, T. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex.* (2012).
51. Tricoire, L. *et al.* Common origins of hippocampal ivy and nitric oxide synthase expressing neurogliaform cells. *J. Neurosci.* **30** (6), 2165-2176, (2010).
52. Cea-del Rio, C.A. *et al.* M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J. Neurosci.* **30** (17), 6011-6024 [doi] (2010).
53. Tricoire, L. *et al.* A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J. Neurosci.* **31** (30), 10948-10970 [doi] (2011).
54. Franz, O., Liss, B., Neu, A., & Roeper, J. Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12** (8), 2685-2693, (2000).
55. Szabo, A. *et al.* Calcium-permeable AMPA receptors provide a common mechanism for LTP in glutamatergic synapses of distinct hippocampal interneuron types. *J. Neurosci.* **32** (19), 6511-6516 [doi] (2012).
56. Hodne, K., & Weltzien, F.A. Single-Cell Isolation and Gene Analysis: Pitfalls and Possibilities. *Int. J. Mol. Sci.* **16** (11), 26832-26849, (2015).
57. Li, H.H. *et al.* Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature.* **335** (6189), 414-417, (1988).
58. Bochet, P. *et al.* Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron.* **12** (2), 383-388, (1994).
59. Audinat, E., Lambolez, B., Rossier, J., & Crepel, F. Activity-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in rat cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* **6** (12), 1792-1800, (1994).
60. Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P.H., & Monyer, H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron.* **12** (6), 1281-1289, (1994).
61. Geiger, J.R. *et al.* Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* **15** (1), 193-204, (1995).
62. Flint, A.C., Maisch, U.S., Weishaupt, J.H., Kriegstein, A.R., & Monyer, H. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J. Neurosci.* **17** (7), 2469-2476, (1997).
63. Angulo, M.C., Lambolez, B., Audinat, E., Hestrin, S., & Rossier, J. Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* **17** (17), 6685-6696, (1997).
64. Lambolez, B., Ropert, N., Perrais, D., Rossier, J., & Hestrin, S. Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (5), 1797-1802, (1996).
65. Liss, B. *et al.* Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J.* **20** (20), 5715-5724, (2001).
66. Aponte, Y., Lien, C.C., Reisinger, E., & Jonas, P. Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J. Physiol.* **574** (Pt 1), 229-243, (2006).

Discussion et perspectives

Discussion des résultats

L'ensemble de ces résultats démontrent que les neurones pyramidaux sont capables d'exercer un contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire. En effet, une photostimulation des neurones pyramidaux à 2 Hz induit des vasodilatations tandis qu'à une fréquence de 20 Hz, elle induit des vasoconstrictions. Le potentiel vasoconstricteur des neurones pyramidaux n'a pas été étudié et nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Ces photostimulations induisent une augmentation de calcium intracellulaire, un prérequis à la synthèse et/ou la libération de messagers vasoactifs (Lauritzen, 2005; Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010), d'autant plus importante que les fréquences sont élevées. Grâce à l'analyse par RT-PCR sur cellule unique, nous avons montré que des sous-populations de neurones pyramidaux ont toutes les enzymes nécessaires à la synthèse de la PGE2 et de la PGF2 α dérivée de la COX-1 ou de la COX-2. Notre analyse pharmacologique démontre que les vasoconstrictions évoquées par les neurones pyramidaux sont dépendantes de l'activité neuronale, de la COX-2 et de l'activation des récepteurs EP1 et EP3 de la PGE2 ainsi que des récepteurs Y1 du NPY. En revanche, ces vasoconstrictions ne semblent pas mettre en jeu la transmission glutamatergique, l'activité de la COX-1, l'activation du récepteur FP de la PGF2 α et des voies vasoconstrictrices décrites pour les astrocytes (Mulligan and MacVicar, 2004; Girouard et al., 2010). Nous avons évalué les propriétés vasoactives de la PGE2 dans notre modèle de tranches corticales de souris par des applications exogènes à différentes concentrations. Nous avons observé qu'à de faibles concentrations, elle est capable d'induire de faibles et rares vasodilatations tandis qu'à plus fortes concentrations elle induit des vasoconstrictions dont l'intensité est dépendante de la concentration. Ainsi, les neurones pyramidaux seraient donc capables à la fois d'initier la réponse neurovasculaire par la libération de PGE2 agissant sur les récepteurs EP2 et EP4 (Cauli and Hamel, 2010; Lacroix et al., 2015) et de la terminer par des vasoconstrictions par la production de PGE2 agissant sur les récepteurs EP1 et EP3 mais aussi par le recrutement d'interneurones qui vont produire du NPY agissant sur les récepteurs Y1 vasculaires.

Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux

Pour cette étude, nous avons utilisé les souris transgéniques Emx1-cre;Ai32 (Gorski et al., 2002; Madisen et al., 2012) permettant l'expression conditionnelle de la channelrhodopsine-

2 dans les neurones pyramidaux et de les activer à différents régimes d'activité par des photostimulation. Ainsi, on a pu discerner, *ex vivo*, les régimes d'activité à 2 Hz et 20 Hz pour lesquels les neurones pyramidaux vont induire des réponses vasculaires opposées. Il y a bien des fréquences préférentielles pour l'induction de réponses neurovasculaires induites par les neurones pyramidaux. Il est cependant difficile de transposer ces résultats aux corrélations entre l'hémodynamique et les rythmes corticaux dans de bandes fréquences élevées tel que le haut gamma (Niessing et al., 2005; Bergel et al., 2018). En effet, la cinétique d'activation du variant de la ChR2 (ChR2_{H134R}) que nous avons utilisé ne nous permet pas de stimuler de manière efficace au-delà d'une fréquence de 20 Hz sans observer une diminution importante du taux de décharge lors des photostimulations des neurones pyramidaux (Lin et al., 2009; Lin, 2011). Nos résultats ont en effet montré que la photostimulation à 20 Hz que les neurones pyramidaux atteignent un taux de succès d'environ 50% à la fin de la photostimulation.

Les vasodilatations observées lors de la photostimulations à 2 Hz des neurones pyramidaux sont beaucoup plus faibles (amplitude = 1.6 ± 4.9 %) que ce qui a pu être observé précédemment en tranches corticales par l'activation des neurones pyramidaux par du NMDA (amplitude = $84.7 \pm 11.9\%$) (Lacroix et al., 2015). L'absence de tonus vasculaire favorise les vasoconstrictions au détriment des vasodilatations (Armstead et al., 1989; Blanco et al., 2008). Ainsi dans nos conditions, l'état relativement dilaté des artérioles pénétrantes pourrait expliquer les faibles vasodilatations que nous avons observées. Par ailleurs, l'activation optogénétique que nous avons utilisée est beaucoup plus localisée (Figure 30) et brève que l'application en bain de NMDA (10 secondes d'activation contre 5 min avec le NMDA) ce qui va vraisemblablement recruter un plus faible nombre de neurones pyramidaux et sur une bien de plus courte durée et donc libérer potentiellement moins de substances vasodilatatrices. De plus, l'activation des récepteurs NMDA entraîne une synthèse et une libération de NO par les interneurons nitroergiques ce qui favorise également les vasodilatations (Lovick and Stezhka, 1999; Rancillac et al., 2006; Mishra et al., 2016).

In vivo, une stimulation mécanique des vibrisses à 8-10 Hz induit une augmentation des potentiels sensoriels évoqués particulièrement marquée dans une bande de fréquences inférieure à 10 Hz. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation de la perfusion sanguine dont près de la moitié dépend de la voie NMDA/COX-2 des neurones pyramidaux (Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). Ces résultats sont confirmés par l'activation optogénétique directe

des neurones pyramidaux qui induisent effectivement une vasodilatation (Uhlirova et al., 2016) et une augmentation du flux sanguin (Ji et al., 2012; Scott and Murphy, 2012; Lacroix et al., 2015). Par ailleurs, la réponse neurovasculaire est optimale quand les vibrisses sont stimulées à 3 Hz (Woolsey et al., 1996) ce qui va dans le sens de notre étude.

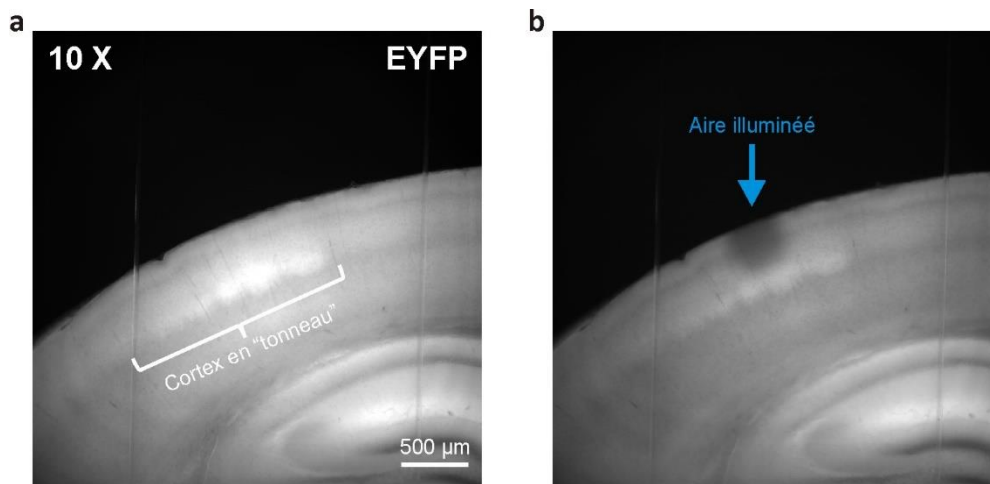


Figure 30 : Estimation de l'aire photostimulée. a) Visualisation à l'objectif 10x de la fluorescence de l'EYFP en fusion avec la ChR2 dans une tranche corticale de souris Emx1-cre ;Ai32. Noter la présence de "tonneaux" en couche IV. **b)** Visualisation du photoblanchiment réalisé par une illumination à la puissance maximale de LED pendant une minute avec un objectif 40X. La surface illuminée représente environ 0.15 mm² de tissu cortical.

De manière similaire à l'augmentation de l'intensité des stimulations électriques extracellulaires entraînant une inversion de la polarité des réponses neurovasculaires (Girouard et al., 2010), l'augmentation des fréquences de photostimulation des neurones pyramidaux favorise la survenue des vasoconstrictions. Dans ces deux cas, l'inversion de la polarité des réponses neurovasculaires s'observe lorsque le Ca²⁺ intracellulaire augmente fortement. Les mécanismes mis en jeu dans notre étude semblent toutefois différents puisqu'ils ne semblent pas impliquer les canaux BK sensibles au Ca²⁺ intracellulaire des astrocytes induisant une libération graduée de K⁺ (Girouard et al., 2010). Au contraire, ils mettraient en jeu une libération accrue de PGE2 dont la synthèse dépend indirectement du Ca²⁺ intracellulaire. Selon les niveaux libérés, elle pourrait activer ses récepteurs vasodilatateurs EP2 et EP4 à faibles concentrations et vasoconstricteurs EP1 et EP3 à fortes concentrations (Woodward et al., 2011) comme le suggèrent les réponses induites par l'application exogène de PGE2 et des observations faites sur des artérioles isolées (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). Ce basculement vers les vasoconstrictions pourrait être par

ailleurs favorisé par l'internalisation rapide du récepteur EP4 induite par une forte concentration de PGE2 (Desai et al., 2000).

L'induction de vasoconstrictions par les neurones pyramidaux via la PGE2

Les vasoconstrictions observées dans notre étude requièrent la décharge de potentiel d'actions pour être évoquées. Ces données supportent un mécanisme antérograde du couplage neurovasculaire par la libération de messagers vasoactifs par des neurones activés (Attwell et al., 2010; Uhlirova et al., 2016). De plus, ces vasoconstrictions sont médiées par la PGE2 dérivée de la COX-2. En effet, les vasoconstrictions évoquées par les neurones pyramidaux sont dépendantes de l'activité de la COX-2 comme pour les vasodilatations (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). La détection de la COX-2 dans les neurones pyramidaux lors de notre étude est en accord avec les données de la littérature d'une expression constitutive de la COX-2 dans les neurones pyramidaux (Yamagata et al., 1993; Breder et al., 1995; Kaufmann et al., 1996; Lecrux et al., 2011; Lacroix et al., 2015). La dichotomie de l'expression des COX dans les neurones pyramidaux suggère deux populations distinctes de neurones pour ces enzymes, la taille assez faible de l'échantillon ne permet toutefois de conclure. Les transcrits de ces enzymes ont en effet été co-détectés par RNAseq dans plusieurs cellules uniques (Tasic et al., 2016). Il reste également à déterminer la présence des protéines correspondantes par immunohistochimie par exemple. Tous les neurones à COX-2 expriment au moins une PGES en accord avec la précédente étude du laboratoire (Lacroix et al., 2015) ce qui permettrait la synthèse de PGE2 par ces neurones. La prédominance de la cPGES et de sa colocalisation avec la COX-2 par rapport aux autres PGES en fait l'enzyme préférentielle de synthèse de PGE2 en condition basale (Vazquez-Tello et al., 2004; Park et al., 2006). La plus faible expression de la mPGES2 et la quasi-absence de la mPGES1 peuvent être expliquées par une expression de ces enzymes surtout lors de processus inflammatoires (Murakami et al., 2000; Sang et al., 2005; Park et al., 2006). Bien qu'elle ne soit pas impliquée dans les vasoconstrictions observées dans notre étude, la PGF2 α peut être synthétisée par les neurones pyramidaux et pourrait plutôt intervenir dans un contexte épileptique (Takei et al., 2012).

Les vasoconstrictions évoquées par les neurones pyramidaux sont essentiellement médiées par la PGE2 via l'activation de son récepteur EP1. L'activation de ce récepteur a déjà été démontrée comme le principal effecteur des vasoconstrictions par la PGE2 par l'utilisation d'

antagonistes spécifiques de ce récepteur (Jadhav et al., 2004; Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). Ces vasoconstrictions font aussi intervenir le récepteur EP3 lors de la phase initiale de la réponse vasculaire. La contribution seule de ce récepteur lors de vasoconstrictions par l'action de la PGE2 est moins renseignée et est évaluée par un antagoniste non-sélectif des récepteurs EP comme le AH-6810 (Tang et al., 2008; Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). L'utilisation du L-798,106 comme antagoniste spécifique du récepteur EP3 (Juteau et al., 2001; Chia et al., 2011) nous a permis de révéler le rôle de ce récepteur lors du début de la réponse.

Nos observations diffèrent des données de la littérature (Zonta et al., 2003; Gordon et al., 2008; Hall et al., 2014; Mishra et al., 2016) qui rapportent des vasodilatations induites par des concentrations micromolaires de PGE2 mais reproduisent les réponses obtenues sur des artérioles isolées et pressurisées (Dabertrand et al., 2013; Czigler et al., 2020). Ces disparités peuvent provenir des conditions expérimentales différentes (e.g. précontraction des vaisseaux, niveau d'oxygénation des tranches), des aires cérébrales étudiées (cortex cérébral vs. hippocampe, rétine ou cortex cérébelleux) ou des segments vasculaires considérés (artériole vs. capillaire).

Le recrutement neuronal lors des vasoconstrictions

Les vasoconstrictions observées lors de la photostimulation à 20 Hz des neurones pyramidaux requiert aussi l'activation des récepteurs Y1 du NPY. C'est un puissant vasoconstricteur qui peut être synthétisé et libéré par des interneurones GABAergiques comme les interneurones à SOM ou les interneurones neurogliaformes à NPY (Tuor et al., 1990; Abounader et al., 1995; Cauli et al., 2004; Karagiannis et al., 2009; Perrenoud et al., 2012; Battaglia et al., 2013; Fuzik et al., 2016). Ces résultats soutiennent aussi l'idée que le NPY est un des agents vasoconstricteurs majeurs recruté lors de stimulations sensorielles ou de neurones GABAergiques (Uhlirva et al., 2016). Ces vasoconstrictions s'initient dans les couches infragranulaires et se rétropropagent jusqu'à la surface corticale suggèrent l'intervention d'interneurones à NPY dans les couches profondes (Perrenoud et al., 2012, 2013; Tasic et al., 2016). L'observation des réponses vasculaires en couche I dans notre étude pourrait aussi favoriser les vasoconstrictions sous-tendues par le NPY ne permettent de confirmer ou d'infirmer une origine profonde des vasoconstrictions. Elles pourraient toutefois mettre en jeu une libération locale de NPY indépendamment d'une rétropropagation. En effet, le

récepteur Y1 du NPY est surtout localisé au niveau des cellules musculaires lisses des artéριοles des couches superficielles (Bao et al., 1997) et la couche I est relativement riche en interneurons à NPY (Karagiannis et al., 2009; Fuzik et al., 2016; Tasic et al., 2016). Par ailleurs, les cellules de Martinotti qui expriment la SOM et le NPY (Fogarty et al., 2007; Karagiannis et al., 2009; Perrenoud et al., 2013) présentent de manière caractéristique des ramifications axonales particulièrement denses dans la couche I. Ces interneurons pourraient donc libérer du NPY en surface tout en ayant un corps cellulaire dans les couches plus profondes. Les neurones à NPY ne semblent pas être recrutés par le glutamate dans notre étude car les vasoconstrictions évoquées ne paraissent pas faire intervenir la transmission glutamatergique excitatrice. Cependant, des neurones expriment les récepteurs de la PGE2 (Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016) et sont susceptibles d'être activés localement par celle-ci (Clasadonte et al., 2011).

D'un autre côté, les astrocytes ne semblent pas impliqués dans la réponse neurovasculaire lors de la photostimulation à 20 Hz des neurones pyramidaux. En effet, les vasoconstrictions observées sont médiées par la PGE2 dérivée de la COX-2 et pas par la PGE2 dérivée de la COX-1 produite essentiellement par les astrocytes (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Mishra et al., 2016). Ces résultats corroborent aussi les travaux faits chez la souris montrant une indépendance à la COX-1 de certaines réponses neurovasculaires (Niwa et al., 2001). De même, le K⁺ libéré par les canaux BK des astrocytes et le 20-HETE produit à partir de l'acide arachidonique des astrocytes, ne sont pas impliqués dans les vasoconstrictions évoquées par la photostimulation des neurones pyramidaux. Cela pourrait être le fait que le recrutement des astrocytes dans le couplage neurovasculaire se fait généralement par la transmission glutamatergique (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Girouard et al., 2010; Mishra et al., 2016) ce qui n'est pas le cas dans notre étude.

Perspectives

Les perspectives vont permettre de comprendre comment cette bascule entre les vasodilatations et les vasoconstrictions induites par les neurones pyramidaux se manifeste *in vivo* et comment l'environnement métabolique, le vieillissement ou des conditions pathologiques pourraient favoriser cette bascule.

La transposition de l'étude à des préparations *in vivo*

Il serait intéressant de transposer nos travaux à des préparations *in vivo* afin d'observer les réponses vasculaires évoquées à des fréquences de 2 Hz et de 20 Hz. Les études *in vivo* sur les neurones pyramidaux n'ont pas encore été effectuées avec un contrôle de la fréquence de stimulation et pourraient permettre de révéler un contrôle bidirectionnel comme il est possible de voir pour l'étude de [Krawchuk et al., 2020](#) avec les interneurons à SOM. De plus, on pourrait aussi confirmer l'importance de la PGE2 et du NPY dans ces réponses par le blocage des récepteurs EP1 de la PGE2 par le ONO-8130 et des récepteurs Y1 du NPY par le BIBP3226 utilisable *in vivo* ([Fang et al., 2006](#); [Miki et al., 2011](#); [Uhlirva et al., 2016](#)).

Le couplage neurovasculaire et le métabolisme

La polarité de la réponse neurovasculaire des neurones pyramidaux pourrait être modifiée en fonction de l'environnement métabolique. L'étude réalisée au laboratoire "Lactate is a major energy substrate for cortical neurons and enhances their firing activity" ([Karagiannis et al., 2021](#)), disponible en annexe, montre que le lactate serait le substrat énergétique préférentiel des neurones par rapport au glucose pour la production d'ATP. De plus, le lactate entraîne aussi une augmentation de la décharge de potentiels d'action par son captage et la fermeture des canaux K_{ATP} exprimés par tous les types de neurones corticaux.

L'étude nous permet de suggérer que lors d'une activation neuronale, les neurones pyramidaux vont induire une vasodilatation pour apporter du glucose à la zone activée qui sera métabolisé par les astrocytes en lactate pour fournir l'énergie nécessaire aux neurones. Lorsque ce lactate atteint un niveau extracellulaire élevé, il va provoquer une augmentation de l'activité neuronale. Cette forte activation de ces neurones glutamatergiques peut engendrer de l'excitotoxicité neuronale et une mort neuronale provenant de l'exposition prolongée au glutamate ([Dong et al., 2009](#)). Ainsi, les neurones pyramidaux pourraient exercer un rétrocontrôle de protection sur la perfusion sanguine en provoquant des vasoconstrictions. Celles-ci diminueraient alors l'apport en glucose sanguin et donc la production de lactate. De plus, une augmentation de lactate extracellulaire peut inhiber la recapture de PGE2 en diminuant le gradient de lactate utilisé comme contre-ion par l'anti-transporteur des prostaglandines (PGT) ([Chan et al., 1998, 2002](#); [Schuster, 2002](#)) et ainsi mener à l'accumulation extracellulaire de PGE2 qui favorise les vasoconstrictions. Cette hypothèse réconcilierait l'hypothèse antérograde du couplage neurovasculaire de l'apport énergétique

dans sa phase initiale et l'hypothèse rétrograde dans une phase plus tardive qui permettrait un rétrocontrôle de la perfusion sanguine pour limiter cet apport énergétique.

Pour tester cette hypothèse, nous avons appliqué du lactate lors de photostimulation à 2 Hz qui normalement induisent des vasodilatations. Nos résultats préliminaires montrent que l'ajout de 15m M de lactate, une concentration qui s'observe dans le sang après un exercice physique intense (Quistorff et al., 2008), à une concentration physiologique de 2.5 mM de glucose (Silver and Erecinska, 1994; Hu and Wilson, 1997) n'a pas d'effet sur le diamètre artériolaire (Figure 31a et b). En revanche, les photostimulation à 2 Hz ont tendance à évoquer des vasoconstrictions avec une amplitude (Figure 31c,d; $\Delta D/D_0 = -9.6 \pm 2.5 \%$) et une magnitude (Figure 31c,e; magnitude = $-54.92 \pm 36.11 \%.min$) alors que sous 10 mM de glucose, une condition avec le même nombre d'atomes de carbone, elles induisent des vasodilatations. Ces résultats préliminaires semblent indiquer un rôle du métabolisme dans la polarité de la réponse neurovasculaire induite par les neurones pyramidaux. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cet effet.

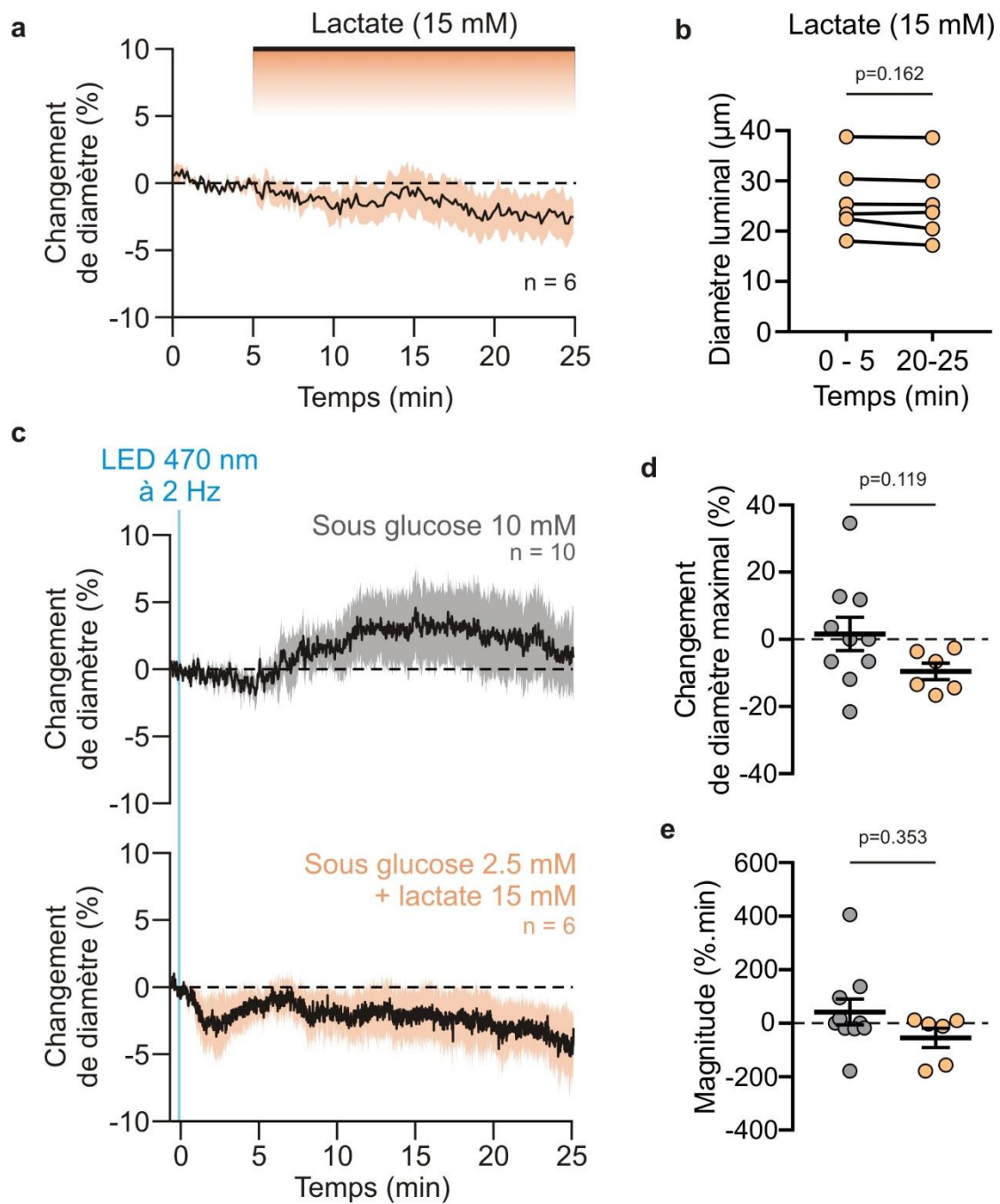


Figure 31 : Le lactate influence la polarité de la réponse neurovasculaire. a) Cinétique des changements de diamètre des artéριοles pénétrantes en couche I par l'application exogène de lactate (15 mM). **b)** Mesure du diamètre luminal sur 5 minutes durant la période de base et après 20 minutes d'application. **c)** Cinétique des changements de diamètre des artéριοles après une photostimulation à 2 Hz en présence de lactate (15 mM, orange) ou non (gris). **d,e)** Changements de diamètre maximaux (d) et magnitude (e) des réponses vasculaires évoquées par la photostimulation à 2 Hz avec ou sans lactate.

Modification du couplage neurovasculaire exercé par les neurones pyramidaux au cours du vieillissement et dans différentes conditions pathologiques

Notre étude est en accord avec la présence d'un couplage neurovasculaire et de l'importance de l'activité des COX à 16 à 21 jours post-natal chez le rongeur (Colonnese et al., 2008). De plus, ce couplage va se modifier avec l'âge (Colonnese et al., 2008) et être impacté jusqu'à une disparition de la désactivation fonctionnelle chez le sujet âgé (Lustig et al., 2003). Il serait donc intéressant d'évaluer l'évolution du couplage neurovasculaire induit par les neurones pyramidaux au cours du vieillissement. Une telle étude nécessite de prendre en compte que l'expression de la ChR2 dans les neurones pyramidaux de la couche II/III peut induire à long-terme (au-delà d'un mois) des anomalies morphologiques et de ciblage de leurs axones (Miyashita et al., 2013). Il sera nécessaire d'effectuer ces vérifications morphologiques si cette étude est réalisée sur des animaux plus âgés et au besoin utiliser des vecteurs viraux conditionnels pour contourner ce problème (Cardin et al., 2010).

Le couplage neurovasculaire peut aussi être précocement altéré dans des maladies neurodégénératives comme dans la maladie d'Alzheimer ce qui pourrait en accélérer sa progression (Iadecola, 2017). Cette pathologie est associée avec l'accumulation de dépôt de peptide amyloïde β et de protéine tau hyperphosphorylée. On peut voir par exemple, que les dépôts amyloïdes extracellulaires vont s'accumuler dans les aires associées à la désactivation fonctionnelle (Lustig et al., 2003; Sperling et al., 2009). Les neurones pyramidaux sont particulièrement enclins à produire (Mucke et al., 2000) et à accumuler des peptides amyloïde β (Clifford et al., 2007) qui les rendent hyperactifs (Zott et al., 2019). Par ailleurs, l'hyperactivité induit aussi une surexpression de COX-2 (Yamagata et al., 1993). De plus l'expression de l'enzyme terminale de synthèse de PGE₂, mPGES-1, est également induite dans la maladie d'Alzheimer dans plusieurs types cellulaires dont les neurones (Akitake et al., 2013). Ces réponses transcriptionnelles augmentent d'autant plus la capacité de synthèse de la PGE₂. Cette hyperactivité pourrait donc conduire à une surproduction de PGE₂ qui entrainerait alors des vasoconstrictions inadaptées aux besoins énergétiques accrus des neurones hyperactifs, une diminution de clairance du peptide amyloïde (Hong et al., 2011; Iliff et al., 2013; Iadecola, 2017) et une inflammation (Martínez-Frailes et al., 2019)(Figure 32). On pourrait ainsi avoir une modification de la balance entre vasodilatation et vasoconstriction en faveur des

vasoconstrictions et ces réponses inadaptées pourraient donc aggraver la progression de la maladie d'Alzheimer.

Il serait donc intéressant de suivre l'évolution du couplage neurovasculaire contrôlé par les neurones pyramidaux dans un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer.

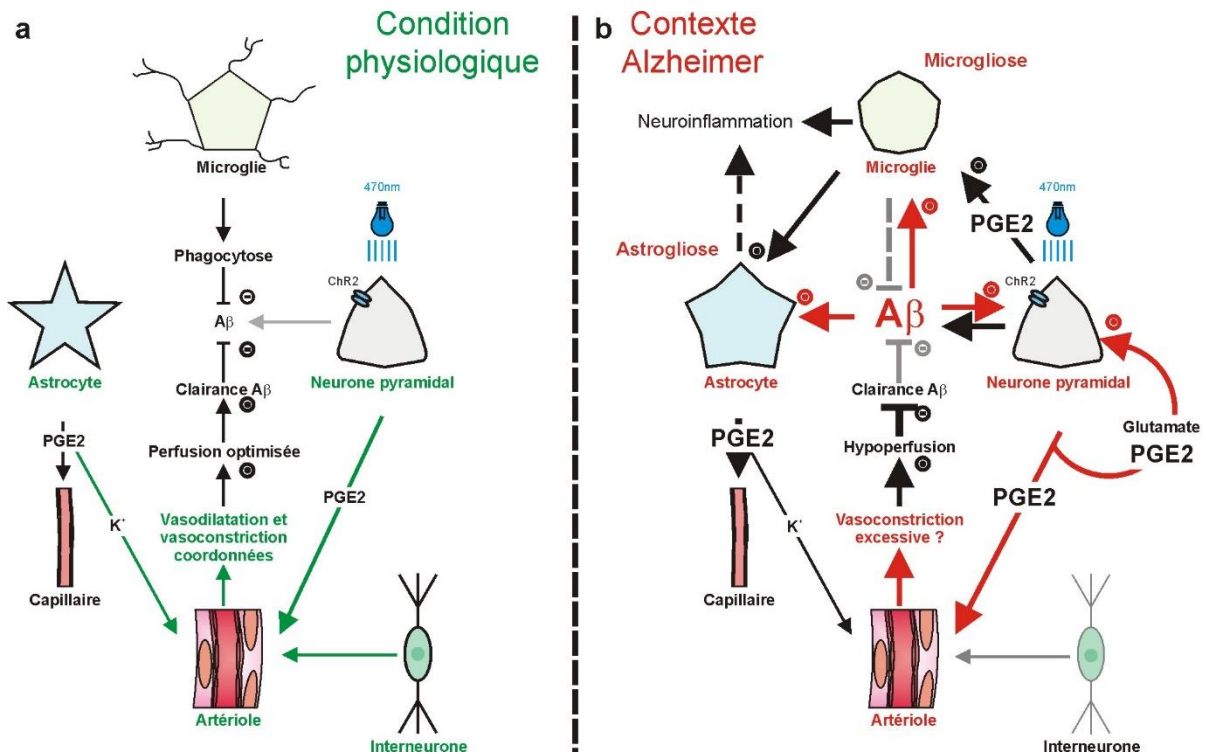


Figure 32 : Hypothèses d'altération du couplage neurovasculaire contrôlé par les neurones pyramidaux dans la maladie d'Alzheimer. a) En condition physiologique, le contrôle du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux, les astrocytes et les interneurons GABAergiques va permettre des vasodilatations et des vasoconstrictions coordonnées, une perfusion adéquate et une clairance des sous-produits toxiques de l'activité neuronale comme le peptide amyloïde β ($A\beta$). b) Dans un contexte de la maladie d'Alzheimer, les neurones pyramidaux vont s'hyperactiver, les interneurons à SOM vont dégénérer et une astrogliose et une microgliose va s'installer ce qui favorise la neuroinflammation. L'ensemble de ces altérations va favoriser les vasoconstrictions, l'hypoperfusion et l'accumulation du peptide $A\beta$ par une clairance altérée. Les flèches à tête pointue et à tête de barre indiquent respectivement un contrôle positif et négatif. Les traits plus épais et plus fins indiquent respectivement une augmentation et une diminution entre la condition physiologique (a) et dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (b). Les phénomènes faibles, en condition physiologique, et altérés dans la MA sont représentés en gris. Les traits pleins et pointillés représentent respectivement des mécanismes directs et indirects

D'autres conditions pathologiques peuvent aussi affecter les différentes cellules de l'unité neuro-glio-vasculaire et la voie de biosynthèse des prostaglandines. Ainsi, le couplage neurovasculaire contrôlé par les neurones pyramidaux pourrait être potentiellement impacté.

L'épilepsie peut induire des hypoperfusions et causer des troubles post-traumatiques de la mémoire et du comportement. Les crises épileptiques sont associées à des vasoconstrictions dépendantes de la COX-2 et des élévations calciques dans les pieds astrocytaires et les cellules musculaires lisses (Tran et al., 2020). De plus, les crises d'épilepsie favorisent la synthèse de la PGF2 α par des neurones pyramidaux de l'hippocampe exprimant la COX-2 et le récepteur FP (Takei et al., 2012). L'hyperactivité de ces neurones pourraient induire des vasoconstrictions par la synthèse et la libération de PGF2 α et ainsi limiter l'apport énergétique malgré une demande importante.

Lors de traumatismes crâniens, des migraines à aura et des accident vasculaires cérébraux cérébrales, on peut observer des dépressions corticales envahissantes (« cortical spreading depression » ou CSD) (Leao, 1944) qui peuvent induire de la neuroinflammation et de l'excitotoxicité. La CSD est caractérisée par une vague de dépolarisation qui se propage dans le néocortex et peut induire une réponse vasculaire qui consiste en une hyperémie suivit d'une réduction de la perfusion (Lauritzen, 1987; Takano et al., 2007; Unekawa et al., 2019). Cette oligémie est dépendante de la synthèse de thromboxane A2 dérivé de la COX-1 et de PGF2a dérivée de la COX-2 (Garipey et al., 2017) et entraîne une hypoxie corticale. Les CSD sont également accompagnée d'un gonflement cellulaire général réduisant l'espace extracellulaire (Chuquet et al., 2007; Zhou et al., 2010) qui peut être observé en visualisant les changements de la transmittance tissulaire de la lumière infrarouge (MacVicar and Hochman, 1991; Holthoff and Witte, 1996). Les CSD peuvent également être induite *in vivo* par une activation optogénétique des neurones pyramidaux (Chung et al., 2018). En réalisant des photostimulations continues de 10 secondes et plus intenses (~ 20 mW/mm²) que celles utilisées dans notre étude, nous avons confirmé l'induction de CSD en tranches corticales lors des travaux réalisés dans le cadre du stage de master de l'étudiante Anna Deàs Just que j'ai co-encadré avec Bruno Cauli (Figure 31). Cette approche pourrait permettre d'étudier à la fois les changements du volume extracellulaire et les réponses vasculaire et pourrait avoir un intérêt dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la migraine à aura (Bolay et al., 2002b; Smith et al., 2020).

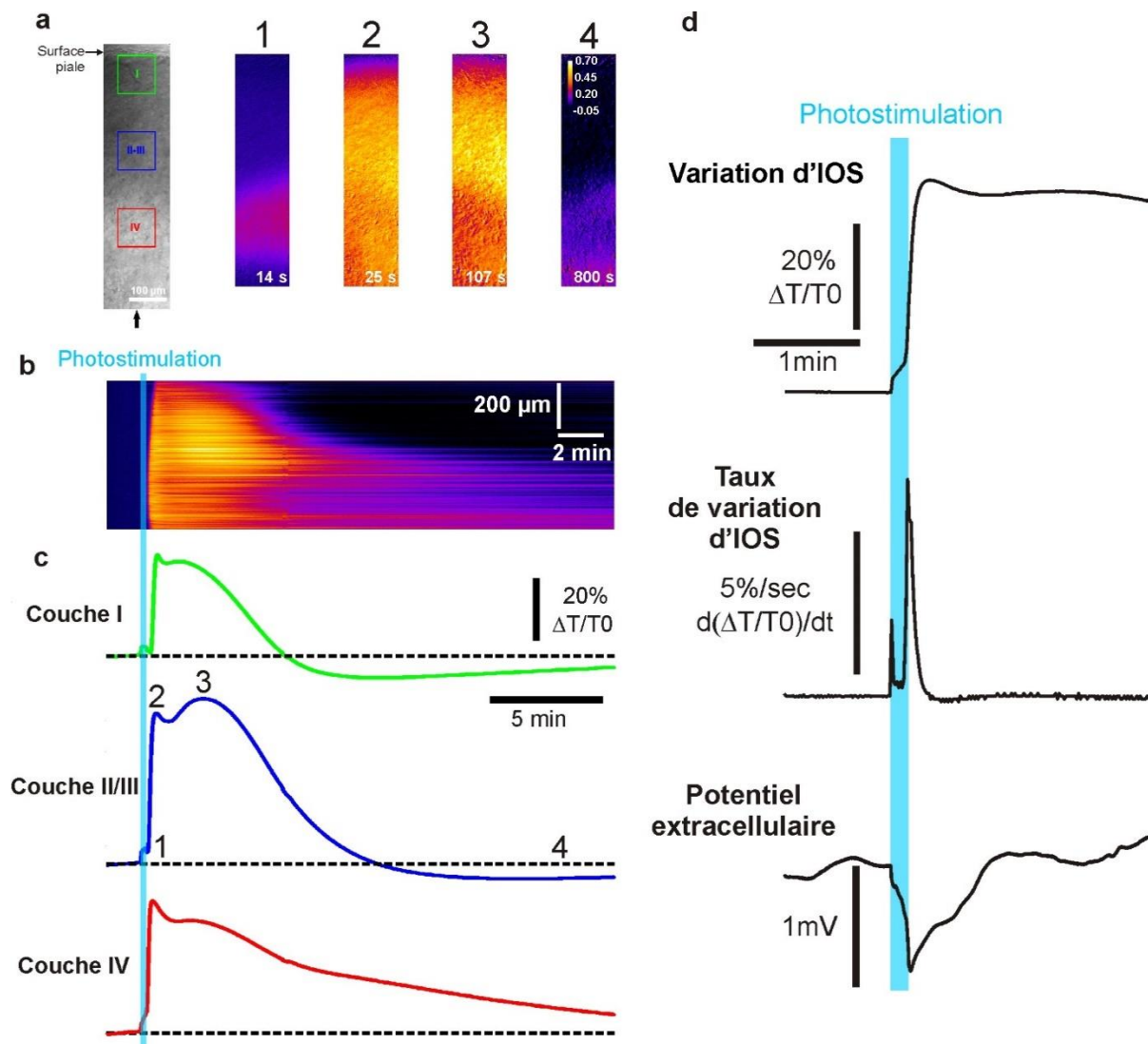


Figure 33 : Induction de dépression corticale envahissante par des photostimulations. **a)** Image infrarouge d'une tranche corticale. La surface piaie est vers le haut. Les carrés verts, bleus et rouges correspondent aux régions d'intérêt dans les couches I, II-III et IV, respectivement. Les changements de transmittance sont représentés dans des images en pseudo-couleurs à différents moments après la photostimulation (1, 2, 3 et 4). **b)** Kymographie montrant les changements du signal optique intrinsèque (IOS) dans une ligne radiale d'intérêt indiquée par la flèche noire en (a). Le site zone bleu clair représente les dix secondes de photostimulation continue. La photostimulation induit une augmentation de la transmittance commençant dans la couche IV et se propageant vers les couches plus superficielles et plus profondes **c)** Changements relatifs IOS dans les couches I, II-III et IV. Les lignes pointillées représentent les lignes de base. Les points (1, 2, 3 et 4) correspondent aux points de temps décrits en (a). Notez le début de l'augmentation de la transmittance initiée dans la couche IV (1). La première (2) et le second (3) pics de l'augmentation de l'IOS sont caractéristiques d'une CSD et d'un gonflement généralisé, respectivement. (4) Les changements de l'IOS diminuent légèrement sous la ligne de base dans les couches I et II-III mais pas dans la couche IV. **d)** IOS (trace supérieure), taux de changement d'IOS (trace centrale) et potentiel extracellulaire (trace inférieure) après la photostimulation. Le taux de changement de l'IOS après une photostimulation supérieure à 2%/sec, caractéristique de l'induction d'une CSD (Zhou et al., 2010), coïncide avec la chute du potentiel extracellulaire. *Adaptée des résultats réalisés par Anna Deàs Just et de la figure présentée dans son rapport de stage de master intitulé « Characterization of optogenetically-induced cortical spreading depressions »*

Dans ces exemples de conditions pathologiques, les niveaux de libération des prostaglandines vont être modifiés, ce qui pourrait altérer le couplage neurovasculaire opéré par les neurones pyramidaux et aggraver le tableau clinique. L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires du couplage neurovasculaire et de leurs altérations dans ces pathologies pourrait être réalisée par l'utilisation de modèles appropriés comme des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, des modèles d'épilepsie ou encore notre modèle d'induction optogénétique de CSD en tranches. Ainsi, la meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre un diagnostic plus précoce et conduire à l'identification de cibles thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des malades.

Conclusion

Les mécanismes du couplage neurovasculaire sont de mieux en mieux compris au fil des années. Mais les études sur ce couplage entre l'activité neuronale et la perfusion sanguine ont aussi dévoilé une complexité cellulaire et moléculaire déconcertante. Depuis les premiers pas de l'étude du couplage neurovasculaire par Roy & Sherrington (Roy and Sherrington, 1890), deux hypothèses majeures ont émergées pour expliquer l'hyperémie fonctionnelle (Attwell and Iadecola, 2002; Iadecola, 2004, 2017; Lauritzen, 2005; Girouard and Iadecola, 2006; Hamel, 2006; Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010, 2018). Une hypothèse rétrograde selon laquelle la demande énergétique du tissu va conduire à l'augmentation de perfusion sanguine et une hypothèse antérograde, qui devient prédominante, où les cellules du néocortex vont synthétiser et libérer des messagers vasoactifs menant à l'hyperémie fonctionnelle. De plus, les mécanismes des vasoconstrictions (Devor et al., 2007) et de l'hypoperfusion (Shmuel et al., 2002; Boorman et al., 2010) observées dans la désactivation fonctionnelle restent encore méconnus.

De nombreux acteurs cellulaires comme les astrocytes (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Girouard et al., 2010; Mishra et al., 2016), les neurones pyramidaux (Lecrux et al., 2011; Scott and Murphy, 2012; Lacroix et al., 2015), les interneurons GABAergiques (Cauli et al., 2004; Anenberg et al., 2015; Uhlirova et al., 2016; Krawchuk et al., 2020) et les cellules endothéliales (Stobart et al., 2013; Longden and Nelson, 2015; Longden et al., 2017; Chow et al., 2020) sont capables de synthétiser et libérer du NO, du K⁺, des neuropeptides et des médiateurs lipidiques qui en agissant sur les cellules murales, vont modifier le calibre des vaisseaux sanguins et le flux sanguin.

De plus en plus d'observations montrent la possibilité d'un contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par certaines cellules du néocortex qui peuvent induire aussi bien des vasodilatations que des vasoconstrictions. Les astrocytes par le potassium selon son niveau de libération (Girouard et al., 2010) ou certains interneurons GABAergiques (Krawchuk et al., 2020) comme les interneurons à NO/NPY (Estrada and DeFelipe, 1998). Notre étude montre que les neurones pyramidaux sont eux aussi capables d'un contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire en induisant des vasodilatations à faible fréquence de stimulation et des vasoconstrictions à de plus fortes fréquences. Les vasoconstrictions que nous avons observées sont induites par la synthèse et la libération de PGE2 dérivée de la COX-2, comme les vasodilatations observées précédemment (Lacroix et al., 2015), mais en agissant

sur ces récepteurs EP1 et EP3. De plus, le NPY pouvant être libéré par des interneurons GABAergiques est aussi impliqué dans ces vasoconstrictions. Cette étude témoigne d'un rôle complexe des neurones pyramidaux et de la PGE2 qu'ils produisent dans le contrôle du couplage neurovasculaire avec un recrutement possible d'interneurones GABAergiques.

On a ici un nouvel exemple montrant que la réponse vasculaire induite par une activité neuronale nécessite des interactions cellulaires et moléculaires complexe au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire (Attwell et al., 2010; Cauli and Hamel, 2010, 2018; Iadecola, 2017). Il est nécessaire de comprendre comment les acteurs cellulaires sont recrutés par les voies afférentes impliquées (Lecrux et al., 2019), la durée des *stimuli* (Cauli and Hamel, 2010) mais aussi selon la nature du *stimulus* ou des segments vasculaires (Mishra et al., 2016; Cauli and Hamel, 2018).

Ce couplage neurovasculaire est à la base des signaux visualisés par des techniques d'imagerie cérébrale fonctionnelle (Raichle and Mintun, 2006; Logothetis, 2008). Toutefois les signaux neuraux et hémodynamiques locaux peuvent être partiellement découplés (O'Herron et al., 2016) et la compréhension des interactions cellulaires et moléculaires complexe qui s'opèrent au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire est essentielle pour mieux interpréter les signaux observés.

Bibliographie

- Abounader, R., and Hamel, E. (1997). Associations between neuropeptide Y nerve terminals and intraparenchymal microvessels in rat and human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* *388*, 444–453.
- Abounader, R., Villemure, J.G., and Hamel, E. (1995). Characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors in human cerebral arteries with selective agonists and the new Y1 antagonist BIBP 3226. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 2245–2250.
- Abounader, R., Elhousseiny, A., Cohen, Z., Olivier, A., Stanimirovic, D., Quirion, R., and Hamel, E. (1999). Expression of neuropeptide Y receptors mRNA and protein in human brain vessels and cerebromicrovascular cells in culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *19*, 155–163.
- van Aerde, K.I., and Feldmeyer, D. (2015). Morphological and physiological characterization of pyramidal neuron subtypes in rat medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* *25*, 788–805.
- Akitake, Y., Nakatani, Y., Kamei, D., Hosokawa, M., Akatsu, H., Uematsu, S., Akira, S., Kudo, I., Hara, S., and Takahashi, M. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in alzheimer's disease and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *J. Neurosci. Res.* *91*, 909–919.
- Alkayed, N.J., Narayanan, J., Gebremedhin, D., Medhora, M., Roman, R.J., and Harder, D.R. (1996). Molecular Characterization of an Arachidonic Acid Epoxygenase in Rat Brain Astrocytes. *Stroke* *27*, 971–979.
- Allen, N.J., and Lyons, D.A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* (80-). *362*, 181–185.
- Andermann, M.L., and Moore, C.I. (2006). A somatotopic map of vibrissa motion direction within a barrel column. *Nat. Neurosci.* *9*, 543–551.
- Andreone, B.J., Lacoste, B., and Gu, C. (2015). Neuronal and Vascular Interactions. *Annu. Rev. Neurosci.* *38*, 25–46.
- Anenberg, E., Chan, A.W., Xie, Y., LeDue, J.M., and Murphy, T.H. (2015). Optogenetic stimulation of GABA neurons can decrease local neuronal activity while increasing cortical blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *35*, 1579–1586.
- Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C., and Vivien, D. (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *40*, 2038–2054.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2129–2142.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* *22*, 208–215.
- Armstead, W.M., Mirro, R., Busija, D.W., and Leffler, C.W. (1989). Vascular responses to vasopressin are tone-dependent in the cerebral circulation of the newborn pig. *Circ. Res.* *64*, 136–144.
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairén, A., et al. (2008a). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., et al. (2008b). Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Attwell, D., and Iadecola, C. (2002). The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* *25*, 621–625.
- Attwell, D., and Laughlin, S.B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *21*, 1133–1145.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* *468*, 232–243.

- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., and Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *36*, 451–455.
- Ayata, C., Ma, J., Meng, W., Huang, P., and Moskowitz, M.A. (1996). L-NA-sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric oxide synthase mutant mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *16*, 539–541.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* *513*, 532–541.
- Baker, A.B. (1937). Structure of the small cerebral arteries and their changes with age. *Am. Heart J.* *14*, 378–379.
- Bao, L., Kopp, J., Zhang, X., Xu, Z.Q., Zhang, L.F., Wong, H., Walsh, J., and Hökfelt, T. (1997). Localization of neuropeptide YY1 receptors in cerebral blood vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12661–12666.
- Barinaga, M. (1995). Remapping the motor cortex. *Science (80-)*. *268*, 1696–1698.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3865–3895.
- Battaglia, D., Karagiannis, A., Gallopin, T., Gutch, H.W., and Cauli, B. (2013). Beyond the frontiers of neuronal types. *Front. Neural Circuits* *7*, 1–22.
- Baughman, R.W., and Gilbert, C.D. (1981). Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J. Neurosci.* *1*, 427–439.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* *81*, 871–927.
- Bergel, A., Deffieux, T., Demené, C., Tanter, M., and Cohen, I. (2018). Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat. Commun.* *9*.
- Bezzi, P., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Volterra, A., Carmignoto, G., Pasti, L., and Pozzan, T. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* *391*, 281–285.
- Bhardwaj, A., Northington, F.J., Carhuapoma, J.R., Falck, J.R., Harder, D.R., Traystman, R.J., and Koehler, R.C. (2000). P-450 epoxygenase and NO synthase inhibitors reduce cerebral blood flow response to N-methyl-D-aspartate. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *279*, 1616–1624.
- Blanco, M., Stern, J.E., and Filosa, J.A. (2008). Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am. J. Physiol.* 2855–2863.
- Blinder, P., Tsai, P.S., Kaufhold, J.P., Knutsen, P.M., Suhl, H., and Kleinfeld, D. (2013). The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nat. Neurosci.* *16*, 889–897.
- Blomstrand, F., Venance, L., Sirén, A.L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H., and Giaume, C. (2004). Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1005–1015.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D. a, and Moskowitz, M. a (2002a). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* *8*, 136–142.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., and Moskowitz, M.A. (2002b). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* *8*, 136–142.
- Bonvento, G., Cholet, N., and Seylaz, J. (2000). Sustained attenuation of the cerebrovascular response to a 10 min whisker stimulation following neuronal nitric oxide synthase inhibition. *Neurosci. Res.* *37*, 163–166.
- Boorman, L., Kennerley, A.J., Johnston, D., Jones, M., Zheng, Y., Redgrave, P., and Berwick, J. (2010). Negative blood oxygen level dependence in the rat: A model for investigating the role of suppression in neurovascular coupling. *J. Neurosci.* *30*, 4285–4294.
- Breder, C.D., Dewitt, D., and Kraig, R.P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* *355*, 296–315.

- Bredt, D.S., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768–770.
- Buerk, D.G., Ances, B.M., Greenberg, J.H., and Detre, J.A. (2003). Temporal Dynamics of Brain Tissue Nitric Oxide during Functional Forepaw Stimulation in Rats. *J. Neurosci.* 23, 1–9.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice provision of metabolic substrates for neurons, and inter-actions with endothelia to create and maintain the b. *Neuron* 23, 297–308.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Busija, D.W., and Heistad, D.D. (1984). Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 101, 161–211.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663–667.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C.I. (2010). Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nat. Protoc.* 5, 247–254.
- Carvell, G.E., and Simons, D.J. (1990). Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J. Neurosci.* 10, 2638–2648.
- Casillo, S.M., Luy, D.D., and Goldschmidt, E. (2020). A History of the Lobes of the Brain. *World Neurosurg.* 134, 353–360.
- Cauli, B., and Hamel, E. (2010). Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front. Neuroenergetics* 2, 9.
- Cauli, B., and Hamel, E. (2018). Brain Perfusion and Astrocytes. *Trends Neurosci.* 41, 409–413.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., and Rossier, J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* 17, 3894–3906.
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., and Audinat, E. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6144–6149.
- Cauli, B., Tong, X.K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., and Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: Relays for subcortical vasoactive pathways. *J. Neurosci.* 24, 8940–8949.
- Cauli, B., Zhou, X., Tricoire, L., Toussay, X., and Staiger, J.F. (2014). Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons. *Front. Neuroanat.* 8, 52.
- Di Cesare, A., Del Piccolo, P., Zacchetti, D., and Grohovaz, F. (2006). EP2 receptor stimulation promotes calcium responses in astrocytes via activation of the adenylyl cyclase pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2546–2553.
- Chan, B.S., Satriano, J.A., Pucci, M., and Schuster, V.L. (1998). Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus* oocytes expressing the prostaglandin transporter “PGT.” *J. Biol. Chem.* 273, 6689–6697.
- Chan, B.S., Endo, S., Kanai, N., and Schuster, V.L. (2002). Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 282, 1097–1102.
- Chédotal, A., Umbriaco, D., Descarries, L., Hartman, B.K., and Hamel, E. (1994). Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationships of choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 343, 57–71.
- Chia, E., Kagota, S., Wijekoon, E.P., and McGuire, J.J. (2011). Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice. *BMC Pharmacol.* 11.

- Cholet, N., Bonvento, G., and Seylaz, J. (1996). Effect of neuronal NO synthase inhibition on the cerebral vasodilatory response to somatosensory stimulation. *Brain Res.* *708*, 197–200.
- Chow, B.W., Nuñez, V., Kaplan, L., Granger, A.J., Bistrong, K., Zucker, H.L., Kumar, P., Sabatini, B.L., and Gu, C. (2020). Caveolae in CNS arterioles mediate neurovascular coupling. *Nature*.
- Chung, D.Y., Sadeghian, H., Qin, T., Lule, S., Lee, H., Karakaya, F., Goins, S., Oka, F., Yaseen, M.A., Houben, T., et al. (2018). Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb. Cortex* *29*, 1–12.
- Chuquet, J., Hollender, L., and Nimchinsky, E.A. (2007). High-Resolution In Vivo Imaging of the Neurovascular Unit during Spreading Depression. *J. Neurosci.* *27*, 4036–4044.
- Clasadonte, J., Poulain, P., Hanchate, N.K., Corfas, G., Ojeda, S.R., and Prevot, V. (2011). Prostaglandin E₂ release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16104–16109.
- Clifford, P.M., Zarrabi, S., Siu, G., Kinsler, K.J., Kosciuk, M.C., Venkataraman, V., D’Andrea, M.R., Dinsmore, S., and Nagele, R.G. (2007). A β peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons. *Brain Res.* *1142*, 223–236.
- Colonnese, M.T., Phillips, M.A., Constantine-Paton, M., Kaila, K., and Jasanoff, A. (2008). Development of hemodynamic responses and functional connectivity in rat somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* *11*, 72–79.
- Connors, B.W., and Gutnick, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* *13*, 99–104.
- Cox, S.B., Woolsey, T.A., and Rovainen, C.M. (1993). Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *13*, 899–913.
- Czigler, A., Toth, L., Szarka, N., Szilágyi, K., Kellermayer, Z., Harci, A., Vecsernyes, M., Ungvari, Z., Szolics, A., Koller, A., et al. (2020). Prostaglandin E₂, a postulated mediator of neurovascular coupling, at low concentrations dilates whereas at higher concentrations constricts human cerebral parenchymal arterioles. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *146*, 106389.
- Dabertrand, F., Hannah, R.M., Pearson, J.M., Hill-Eubanks, D.C., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (2013). Prostaglandin E₂, a postulated astrocyte-derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 479–482.
- Davis, M.J., and Hill, M.A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.* *79*, 387–423.
- DeFelipe, J., and Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* *39*, 563–607.
- DeFelipe, J., Zamudio, J.R., Jong, R.M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., Ward, A.J., Raj, A., Lee, J., Sharp, P.A., et al. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 202–216.
- Deffieux, T., Demené, C., and Tanter, M. (2021). Functional Ultrasound Imaging: A New Imaging Modality for Neuroscience. *Neuroscience*.
- Demene, C., Baranger, J., Bernal, M., Delanoe, C., Auvin, S., Biran, V., Alison, M., Mairesse, J., Harribaud, E., Pernot, M., et al. (2017). Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Sci. Transl. Med.* *9*.
- Desai, S., April, H., Nwaneshiudu, C., and Ashby, B. (2000). Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol. Pharmacol.* *58*, 1279–1286.
- Dessalles, C.A., Babataheri, A., and Barakat, A.I. (2021). Pericyte mechanics and mechanobiology.
- Devienne, G., Le Gac, B., Piquet, J., and Cauli, B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-Clamp. *J. Vis. Exp.* *136*, 1–12.

- Devor, A., Tian, P., Nishimura, N., Teng, I.C., Hillman, E.M.C., Narayanan, S.N., Ulbert, I., Boas, D.A., Kleinfeld, D., and Dale, A.M. (2007). Suppressed Neuronal Activity and Concurrent Arteriolar Vasoconstriction May Explain Negative Blood Oxygenation Level-Dependent Signal. *J. Neurosci.* 27, 4452–4459.
- Devor, A., Hillman, E.M.C., Tian, P., Waeber, C., Teng, I.C., Ruvinskaya, L., Shalinsky, M.H., Zhu, H., Haslinger, R.H., Narayanan, S.N., et al. (2008). Stimulus-Induced Changes in Blood Flow and 2-Deoxyglucose Uptake Dissociate in Ipsilateral Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* 28, 14347–14357.
- Devor, A., Sakadžić, S., Saisan, P.A., Yaseen, M.A., Roussakis, E., Srinivasan, V.J., Vinogradov, S.A., Rosen, B.R., Buxton, R.B., Dale, A.M., et al. (2011). “Overshoot” of O₂ is required to maintain baseline tissue oxygenation at locations distal to blood vessels. *J. Neurosci.* 31, 13676–13681.
- Dietrich, H.H., Kajita, Y., and Dacey, R.G. (1996). Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 271.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., and Villringer, A. (1993). Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci. Lett.* 149, 43–46.
- Dotdt, H.-U., Eder, M., Schierloh, A., and Zieglgansberger, W. (2002). Infrared-Guided Laser Stimulation of Neurons in Brain Slices. *Sci. Signal.* 2002, pl2–pl2.
- Dong, X.X., Wang, Y., and Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 379–387.
- Drouin, A., and Thorin, E. (2009). Flow-Induced Dilation Is Mediated By Akt-Dependent Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Hydrogen Peroxide in Mouse Cerebral Arteries. *Stroke* 40, 1827–1833.
- Duchemin, S., Boily, M., Sadekova, N., and Girouard, H. (2012). The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front. Neural Circuits* 6, 1–19.
- Duvernoy, H.M., Delon, S., and Vannson, J.L. (1981). Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Res. Bull.* 7, 519–579.
- Egemen, E., and Solaroglu, I. (2017). Anatomy of Cerebral Veins and Dural Sinuses. *Prim. Cerebrovasc. Dis. Second Ed.* 32–36.
- Estrada, C., and DeFelipe, J. (1998). Feature article: Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: Morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. *Cereb. Cortex* 8, 193–203.
- Estrada, C., Mengual, E., and Gonzalez, C. (1993). Local NADPH-diaphorase neurons innervate pial arteries and lie close or project to intracerebral blood vessels: A possible role for nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 978–984.
- Fahrenkrug, J., Hannibal, J., Tams, J., and Georg, B. (2000). Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: Relation to PACAP and VIP containing nerves. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1205–1214.
- Fairént, A., Regidort, J., and Kruger, L. (1992). The Cerebral Cortex of the Mouse (A First Contribution—The “Acoustic” Cortex). *Somatosens. Mot. Res.* 9, 3–36.
- Fang, Q., Guo, J., He, F., Peng, Y. li, Chang, M., and Wang, R. (2006). In vivo inhibition of neuropeptide FF agonism by BIBP3226, an NPY Y1 receptor antagonist. *Peptides* 27, 2207–2213.
- Faraci, F.M., and Breese, K.R. (1993). Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N- methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ. Res.* 72, 476–480.
- Faraci, F.M., and Sobey, C.G. (1998). Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1047–1063.
- Figuroa, X.F., and Duling, B.R. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 251–266.
- Filosa, J. a, Bonev, A.D., Straub, S. V, Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W., and Nelson, M.T. (2006). Local

- potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat. Neurosci.* 9, 1397–1403.
- Filosa, J.A., Morrison, H.W., Iddings, J.A., Du, W., and Kim, K.J. (2016). Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience* 323, 96–109.
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marín, O., Pachnis, V., and Kessaris, N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J. Neurosci.* 27, 10935–10946.
- Fox, K. (1992). A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 12, 1826–1838.
- Fox, P.T., and Raichle, M.E. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1140–1144.
- Freund, T.F., and Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron* 56, 33–42.
- Freygang, W.H., and Sokoloff, L. (1959). Quantitative Measurement of Regional Circulation in the Central Nervous System by the use of Radioactive Inert Gas. pp. 263–279.
- Fritsch, G., and Hitzig, E. (2009). Electric excitability of the cerebrum (Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns). *Epilepsy Behav.* 15, 123–130.
- Fulton, J.F. (1928). OBSERVATIONS UPON THE VASCULARITY OF THE HUMAN OCCIPITAL LOBE DURING VISUAL ACTIVITY. *Brain* 51, 310–320.
- Fuzik, J., Zeisel, A., Máté, Z., Calvigioni, D., Yanagawa, Y., Szabó, G., Linnarsson, S., and Harkany, T. (2016). Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* 34, 175–183.
- Gabbott, P.L.A., Dickie, B.G.M., Vaid, R.R., Headlam, A.J.N., and Bacon, S.J. (1997). Local-Circuit Neurones in the Medial Prefrontal Cortex (Areas 25, 32 and 24b) in the Rat: Morphology and Quantitative Distribution Indexing terms: calcium-binding proteins; GABA; NADPH diaphorase; cortical modules; limbic system. *J. Comp. Neurol* 377, 465–499.
- Gariépy, H., Zhao, J., and Levy, D. (2017). Differential contribution of COX-1 and COX-2 derived prostanoids to cortical spreading depression — Evoked cerebral oligemia.
- Gebremedhin, D., Lange, A.R., Lowry, T.F., Taheri, M.R., Birks, E.K., Hudetz, A.G., Narayanan, J., Falck, J.R., Okamoto, H., Roman, R.J., et al. (2000). Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ. Res.* 87, 60–65.
- Gibson, J.R., Belerlein, M., and Connors, B.W. (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75–79.
- Girouard, H., and Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J. Appl. Physiol.* 100, 328–335.
- Girouard, H., Park, L., Anrather, J., Zhou, P., and Iadecola, C. (2007). Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 303–309.
- Girouard, H., Bonev, A.D., Hannah, R.M., Meredith, A., Aldrich, R.W., and Nelson, M.T. (2010). Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3811–3816.
- Gordon, G.R.J., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C.R., and MacVicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–749.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314.
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O’Farrell, F.M., Buchan, A.M.,

- Lauritzen, M., and Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60.
- Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* 100, 1059–1064.
- Hamilton, N.B. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics* 2, 1–14.
- Hannah, R.M., Dunn, K.M., Bonev, A.D., and Nelson, M.T. (2011). Endothelial SKCa and IKCa channels regulate brain parenchymal arteriolar diameter and cortical cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1175–1186.
- Hein, T.W., Xu, W., and Kuo, L. (2006). Dilation of retinal arterioles in response to lactate: Role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 693–699.
- Herman, M.A., and Jahr, C.E. (2007). Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci.* 27, 9736–9741.
- Hill-Eubanks, D.C., Gonzales, A.L., Sonkusare, S.K., and Nelson, M.T. (2014). Vascular TRP channels: Performing under pressure and going with the flow. *Physiology* 29, 343–360.
- Hill, L. (1896). *The Physiology and Pathology of the Cerebral Circulation: an experimental research.* *Am. J. Med. Sci.* 112, 702–703.
- Hill, R.A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., and Grutzendler, J. (2015). Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* 87, 95–110.
- Hodge, C., Stevens, R., Yamamoto, T., Nguyen, T., Dubroff, J., Zhu, W., and McCasland, J. (2002). A new model of cortical plasticity using rat whisker barrel cortex. *Int. Congr. Ser.* 1247, 383–393.
- Holthoff, K., and Witte, O.W. (1996). Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J. Neurosci.* 16, 2740–2749.
- Hong, S., Quintero-Monzon, O., Ostaszewski, B.L., Podlisny, D.R., Cavanaugh, W.T., Yang, T., Holtzman, D.M., Cirrito, J.R., and Selkoe, D.J. (2011). Dynamic analysis of amyloid β -protein in behaving mice reveals opposing changes in isf versus parenchymal $a\beta$ during age-related plaque formation. *J. Neurosci.* 31, 15861–15869.
- Horiuchi, T., Dietrich, H.H., Hongo, K., and Dacey, R.G. (2002). Mechanism of extracellular K⁺-induced local and conducted responses in cerebral penetrating arterioles. *Stroke* 33, 2692–2699.
- Houades, V., Rouach, N., Ezan, P., Kirchhoff, F., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol.* 2, 3–14.
- Houser, C.R., Hendry, S.H.C., Jones, E.G., and Vaughn, J.E. (1983). Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J. Neurocytol.* 12, 617–638.
- Hu, Y., and Wilson, G.S. (1997). Rapid changes in local extracellular rat brain glucose observed with an in vivo glucose sensor. *J. Neurochem.* 68, 1745–1752.
- Hubel, D.H., and Wiesel, T.N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160, 106–154.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360.
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96, 17–42.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376.

- Iliff, J.J., Lee, H., Yu, M., Feng, T., Logan, J., Nedergaard, M., Benveniste, H., Wang, M., Zeppenfeld, D.M., Venkataraman, A., et al. (2012). A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci. Transl. Med.* *4*.
- Iliff, J.J., Wang, M., Zeppenfeld, D.M., Venkataraman, A., Plog, B.A., Liao, Y., Deane, R., and Nedergaard, M. (2013). Cerebral Arterial Pulsation Drives Paravascular CSF – Interstitial Fluid Exchange in the Murine Brain. *J. Neurosci.* *33*, 18190–18199.
- Irikura, K., Maynard, K.I., and Moskowitz, M.A. (1994). Importance of nitric oxide synthase inhibition to the attenuated vascular responses induced by topical L-nitroarginine during vibrissal stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *14*, 45–48.
- Itakura, T., Yokote, H., Okuno, T., Naka, Y., Nakakita, K., Kamei, I., Nakai, K., Imai, H., and Komai, N. (1987). Regulation of rCBF by intracortical vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons. *J. Neurosurg.* *67*, 93–96.
- Izzetoglu, M., Izzetoglu, K., Bunce, S., Ayaz, H., Devaraj, A., Onaral, B., and Pourrezaei, K. (2005). Functional Near-Infrared Neuroimaging. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* *13*, 153–159.
- Jadhav, V., Jabre, A., Lin, S.Z., and Lee, T.J.F. (2004). EP1- and EP3-receptors mediate prostaglandin E 2-induced constriction of porcine large cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *24*, 1305–1316.
- Ji, L., Zhou, J., Zafar, R., Kantorovich, S., Jiang, R., Carney, P.R., and Jiang, H. (2012). Cortical Neurovascular Coupling Driven by Stimulation of Channelrhodopsin-2. *PLoS One* *7*.
- Ji, X., Ferreira, T., Friedman, B., Liu, R., Liechty, H., Bas, E., Chandrashekar, J., and Kleinfeld, D. (2021). Brain microvasculature has a common topology with local differences in geometry that match metabolic load. *Neuron* *109*, 1168-1187.e13.
- Jones, E.G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *J. Anat.* *106*, 507–520.
- Jones, E.G. (1975). Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* *160*, 205–267.
- Jones, E.G. (1993). GABAergic Neurons and Their Role in Cortical Plasticity in Primates. *Cereb. Cortex* *3*, 361–372.
- Juteau, H., Gareau, Y., Labelle, M., Lamontagne, S., Tremblay, N., Carrière, M.C., Sawyer, N., Denis, D., and Metters, K.M. (2001). Structure-activity relationship on the human EP3 prostanoid receptor by use of solid-support chemistry. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *11*, 747–749.
- Karagiannis, A., Gallopin, T., Dávid, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., Hillman, E.M.C., Staiger, J.F., and Cauli, B. (2009). Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* *29*, 3642–3659.
- Karagiannis, A., Gallopin, T., Lacroix, A., Plaisier, F., Piquet, J., Geoffroy, H., Hepp, R., Naudé, J., Le Gac, B., Egger, R., et al. (2021). LACTATE IS A MAJOR ENERGY SUBSTRATE FOR CORTICAL NEURONS AND ENHANCES THEIR FIRING ACTIVITY. *BioRxiv* 2021.05.17.444414.
- Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Peggii, J., Bremerii, M., and Isaksonii, P. (1996). COX-2 , a synaptically induced enzyme , is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *93*, 2317–2321.
- Kawaguchi, Y. (1993). Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* *69*, 416–431.
- Kawaguchi, Y. (1995). Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.* *15*, 2638–2655.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin(D28k)-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* *70*, 387–396.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1996). Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J. Neurosci.* *16*, 2701–2715.

- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486.
- Kempermann, G., Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., et al. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23, 25–30.
- Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–659.
- Kety, S.S., and Schmidt, C.F. (1945). THE DETERMINATION OF CEREBRAL BLOOD FLOW IN MAN BY THE USE OF NITROUS OXIDE IN LOW CONCENTRATIONS. *Am. J. Physiol.* Content 143, 53–66.
- Kety, S.S., and Schmidt, C.F. (1948). the Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *J. Clin. Invest.* 27, 476–483.
- Kim, K.J., and Filosa, J.A. (2012). Advanced in vitro approach to study neurovascular coupling mechanisms in the brain microcirculation. *J. Physiol.* 590, 1757–1770.
- Kim, K.J., Filosa, J.A., Kim, K.J., and Filosa, J.A. (2012). Advanced in vitro approach to study neurovascular coupling mechanisms in the brain microcirculation. *J Physiol J. Physiol. C Physiol. Soc. J Physiol* 5907, 1757–1770.
- Kleinfeld, D., Mitra, P.P., Helmchen, F., and Denk, W. (1998). Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15741–15746.
- Knot, H.J., and Nelson, M.T. (1998). Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J. Physiol.* 508, 199–209.
- Knot, H.J., Zimmermann, P.A., and Nelson, M.T. (1996). Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. *J. Physiol.* 492, 419–430.
- Ko, K.R., Ngai, A.C., and Winn, H.R. (1990). Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 259.
- Krawchuk, M.B., Ruff, C.F., Yang, X., Ross, S.E., and Vazquez, A.L. (2020). Optogenetic assessment of VIP, PV, SOM and NOS inhibitory neuron activity and cerebral blood flow regulation in mouse somato-sensory cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 40, 1427–1440.
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.P., and Jung, F. (2019). Vascular endothelial cell biology: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Kubota, Y., Hattori, R., and Yui, Y. (1994). Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res.* 649, 159–173.
- Kuschinsky, W., Wahl, M., Bosse, O., and Thurau, K. (1972). Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ. Res.* 31, 240–247.
- Lacroix, A., Toussay, X., Anenberg, E., Lecrux, C., Ferreirós, N., Karagiannis, A., Plaisier, F., Chausson, P., Jarlier, F., Burgess, S.A., et al. (2015). COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 35, 11791–11810.
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F., and Rossier, J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron* 9, 247–258.
- Lassen, N.A., Ingvar, D.H., and Skinhøj, E. (1978). Brain Function and Blood Flow. *Sci. Am.* 239, 62–71.
- Lauritzen, M. (1987). Regional cerebral blood flow during cortical spreading depression in rat brain: increased reactive hyperperfusion in low-flow states. *Acta Neurol. Scand.* 75, 1–8.
- Lauritzen, M. (2005). Reading vascular changes in brain imaging: Is dendritic calcium the key? *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 77–85.
- Leao, A.A.P. (1944). SPREADING DEPRESSION OF ACTIVITY IN THE CEREBRAL CORTEX. *J. Neurophysiol.* 7, 359–390.

- Lebeux, Y.J., and Willemot, J. (1978). Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes. *Anat. Rec.* *190*, 811–826.
- Lecrux, C., Toussay, X., Kocharyan, A., Fernandes, P., Neupane, S., Levesque, M., Plaisier, F., Shmuel, A., Cauli, B., and Hamel, E. (2011). Pyramidal Neurons Are “Neurogenic Hubs” in the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *J. Neurosci.* *31*, 9836–9847.
- Lecrux, C., Bourourou, M., and Hamel, E. (2019). How reliable is cerebral blood flow to map changes in neuronal activity? *Auton. Neurosci. Basic Clin.* *217*, 71–79.
- Lee, R.M.K.W. (1995). Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol. Ther.* *66*, 149–173.
- Lehoux, S., Castier, Y., and Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J. Intern. Med.* *259*, 381–392.
- Li, D., Héroult, K., Isacoff, E.Y., Oheim, M., and Ropert, N. (2012). Optogenetic activation of LiGluR-expressing astrocytes evokes anion channel-mediated glutamate release. *J. Physiol.* *590*, 855–873.
- Lin, J.Y. (2011). A user’s guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp. Physiol.* *96*, 19–25.
- Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., and Tsien, R.Y. (2009). Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys. J.* *96*, 1803–1814.
- Lind, B.L., Brazhe, A.R., Jessen, S.B., Tan, F.C.C., and Lauritzen, M.J. (2013). Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E4678–E4687.
- Lind, B.L., Jessen, S.B., Lønstrup, M., Joséphine, C., Bonvento, G., and Lauritzen, M. (2018). Fast Ca²⁺ responses in astrocyte end-feet and neurovascular coupling in mice. *Glia* *66*, 348–358.
- Lindauer, U., Leithner, C., Kaasch, H., Rohrer, B., Foddiss, M., Füchtmeier, M., Offenhauser, N., Steinbrink, J., Rojl, G., Kohl-Bareis, M., et al. (2010). Neurovascular coupling in rat brain operates independent of hemoglobin deoxygenation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 757–768.
- Liu, X., Li, C., Falck, J.R., Roman, R.J., Harder, D.R., and Koehler, R.C. (2008a). Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *295*, 619–631.
- Liu, Y., Li, H., Bubolz, A.H., Zhang, D.X., and Gutterman, D.D. (2008b). Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. *Med. Biol. Eng. Comput.* *46*, 469–478.
- Logothetis, N.K. (2007). The ins and outs of fMRI signals. *Nat. Neurosci.* *10*, 1230–1232.
- Logothetis, N.K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* *453*, 869–878.
- Logothetis, N.K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., and Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal.
- Long, J.B., Rigamonti, D.D., Dosaka, K., Kraimer, J.M., and Martinez-Arizala, A. (1992). Somatostatin causes vasoconstriction, reduces blood flow and increases vascular permeability in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *260*, 1425–1432.
- Longden, T.A., and Nelson, M.T. (2015). Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation* *22*, 183–196.
- Longden, T.A., Dabertrand, F., Koide, M., Gonzales, A.L., Tykocki, N.R., Brayden, J.E., Hill-Eubanks, D., and Nelson, M.T. (2017). Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* *20*, 717–726.
- Lovick, T.A., and Stezhka, V. V. (1999). Neurones in the dorsolateral periaqueductal grey matter in coronal slices of rat midbrain: Electrophysiological and morphological characteristics. *Exp. Brain Res.* *124*, 53–58.
- Lu, D., and Kassab, G.S. (2011). Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J. R. Soc. Interface* *8*, 1379–1385.

- Lu, H.B., Zou, Q.H., Gu, H., Raichle, M.E., Stein, E.A., and Yang, Y.H. (2012). Rat brains also have a default mode network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3979–3984.
- Lustig, C., Snyder, A.Z., Bhakta, M., O'Brien, K.C., McAvoy, M., Raichle, M.E., Morris, J.C., and Buckner, R.L. (2003). Functional deactivations: change with age and dementia of the Alzheimer type. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14504–14509.
- Lyons, D.G., Parpaleix, A., Roche, M., and Charpak, S. (2016). Mapping oxygen concentration in the awake mouse brain. *Elife* *5*, 1–16.
- Ma, J., Ayata, C., Huang, P.L., Fishman, M.C., and Moskowitz, M.A. (1996). Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *270*.
- Ma, Y., Shaik, M.A., Kozberg, M.G., Kim, S.H., Portes, J.P., and Timerman, D. (2016). Resting-state hemodynamics are spatiotemporally coupled to synchronized and symmetric neural activity in excitatory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., and Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* *8*, 662–664.
- MacVicar, B.A., and Hochman, D. (1991). Imaging of Synaptically Evoked Intrinsic Optical Signals in Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* *11*, 1458–1469.
- Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J., Berenyi, A., Fujisawa, S., Hsu, Y.-W. a, Garcia, A.J., Gu, X., Zanella, S., et al. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* *15*, 793–802.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.* *19*, 235–249.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 793–807.
- Martínez-Frailes, C., Di Lauro, C., Bianchi, C., De Diego-García, L., Sebastián-Serrano, Á., Boscá, L., and Díaz-Hernández, M. (2019). Amyloid peptide induced neuroinflammation increases the P2X7 receptor expression in microglial cells, impacting on its functionality. *Front. Cell. Neurosci.* *13*, 1–15.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* *58*, 1094–1103.
- Mazaré, N., Oudart, M., and Cohen-Salmon, M. (2021). Local translation in perisynaptic and perivascular astrocytic processes - A means to ensure astrocyte molecular and functional polarity? *J. Cell Sci.* *134*.
- McCaslin, A.F.H., Chen, B.R., Radosevich, A.J., Cauli, B., and Hillman, E.M.C. (2011). In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: Implications for neurovascular coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *31*, 795–806.
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., and Prince, D.A. (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* *54*, 782–806.
- Metea, M.R., and Newman, E.A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J. Neurosci.* *26*, 2862–2870.
- Meynert, T. (1888). *Psychiatrie: Clinique des maladies du cerveau antérieur basée sur sa structure, ses fonctions et sa nutrition.* trans. G. Cousot.
- Miki, T., Matsunami, M., Nakamura, S., Okada, H., Matsuya, H., and Kawabata, A. (2011). ONO-8130, a selective prostanoid EP1 receptor antagonist, relieves bladder pain in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Pain* *152*, 1373–1381.
- Mishra, A. (2017). Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature. *J. Physiol.* *595*, 1885–1902.

- Mishra, A., O'Farrell, F.M., Reynell, C., Hamilton, N.B., Hall, C.N., and Attwell, D. (2014). Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinæ. *Nat. Protoc.* *9*, 323–336.
- Mishra, A., Reynolds, J.P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D.A., and Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat. Neurosci.* *19*, 1619–1627.
- Miyashita, T., Shao, Y.R., Chung, J., Pourzia, O., and Feldman, D.E. (2013). Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front. Neural Circuits* *7*, 8.
- Molnár, G., Faragó, N., Kocsis, Á.K., Rózsa, M., Lovas, S., Boldog, E., Báldi, R., Csajbók, É., Gardi, J., Puskás, L.G., et al. (2014). GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* *34*, 1133–1137.
- Morgado, M., Cairrão, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2012). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 247–266.
- Moskalenko, Y.E., Woolsey, T.A., Rovainen, C., Weinstein, G.B., Liu, D., Semernya, V.N., and Mitrofanov, V.F. (1998). Blood flow dynamics in different layers of the somatosensory region of the cerebral cortex on the rat during mechanical stimulation of the vibrissae. *Neurosci. Behav. Physiol.* *28*, 459–467.
- Mosso Angelo (1880). Sulla circolazione del cervello dell'uomo. *Atti Della R. Accad. Dei Lincei* *5*, 237–358.
- Mountcastle, V.B. (1957). MODALITY AND TOPOGRAPHIC PROPERTIES OF SINGLE NEURONS OF CAT'S SOMATIC SENSORY CORTEX. *J. Neurophysiol.* *20*, 408–434.
- Mountcastle, V.B., Talbot, W.H., Sakata, H., and Hyvärinen, J. (1969). Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination. *J. Neurophysiol.* *32*, 452–484.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* *20*, 4050–4058.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* *431*, 195–199.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Ohishi, S., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* *275*, 32783–32792.
- Ndubuizu, O., and LaManna, J.C. (2007). Brain tissue oxygen concentration measurements. *Antioxidants Redox Signal.* *9*, 1207–1219.
- Ngai, A.C., Ko, K.R., Morii, S., and Winn, H.R. (1988). Effect of sciatic nerve stimulation on pial arterioles in rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *254*.
- Nguyen, T.S., Winn, H.R., and Janigro, D. (2000). ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *278*, 878–885.
- Niessing, J., Ebisch, B., Schmidt, K.E., Niessing, M., Singer, W., and Galuske, R.A.W. (2005). Neuroscience: Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* (80-.). *309*, 948–951.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* *64*, 313–353.
- Niwa, K., Araki, E., Morham, S.G., Ross, M.E., and Iadecola, C. (2000). Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J. Neurosci.* *20*, 763–770.
- Niwa, K., Haensel, C., Ross, M.E., and Iadecola, C. (2001). Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ. Res.* *88*, 600–608.
- Nizar, K., Uhlirova, H., Tian, P., Saisan, P.A., Cheng, Q., Reznichenko, L., Weldy, K.L., Steed, T.C., Sridhar, V.B., MacDonald, C.L., et al. (2013). In vivo Stimulus-Induced Vasodilation Occurs without IP3 Receptor Activation and

- May Precede Astrocytic Calcium Increase. *J. Neurosci.* *33*, 8411–8422.
- De Nó, L.R. (1949). Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. *Physiol. Nerv. Syst.*
- Northington, F.J., Matherne, G.P., and Berne, R.M. (1992). Competitive inhibition of nitric oxide synthase prevents the cortical hyperemia associated with peripheral nerve stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6649–6652.
- O’Herron, P., Chhatbar, P.Y., Levy, M., Shen, Z., Schramm, A.E., Lu, Z., and Kara, P. (2016). Neural correlates of single-vessel haemodynamic responses in vivo. *Nature* *534*, 378–382.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R.M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* *19*, 1584–1596.
- Ogawa, S., and Lee, T. -M (1990). Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: In vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magn. Reson. Med.* *16*, 9–18.
- Ogawa, S., Lee, T. -M, Nayak, A.S., and Glynn, P. (1990). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn. Reson. Med.* *14*, 68–78.
- Oláh, S., Komlósi, G., Szabadics, J., Varga, C., Tóth, É., Barzó, P., and Tamás, G. (2007). Output of neurogliaform cells to various neuron types in the human and rat cerebral cortex. *Front. Neural Circuits* *1*, 1–7.
- Osol, G., Brekke, J.F., McElroy-Yaggy, K., and Gokina, N.I. (2002). Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: A three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *283*, 2260–2267.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* *125*, 775–784.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* (80-). *333*, 1456–1458.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* *119*, 229–240.
- Patel, U. (1983). Non-random distribution of blood vessels in the posterior region of the rat somatosensory cortex. *Brain Res.* *289*, 65–70.
- Penfield, W., and Boldrey, E. (1937). Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain* *60*, 389–443.
- Penfield, W., and Rasmussen, T. (1950). The Cerebral Cortex of Man: Clinical Study of Localization of Function. *Acad. Med.* *25*, 375.
- Peng, X., Carhuapoma, J.R., Bhardwaj, A., Alkayed, N.J., Falck, J.R., Harder, D.R., Traystman, R.J., and Koehler, R.C. (2002). Suppression of cortical functional hyperemia to vibrissal stimulation in the rat by epoxygenase inhibitors. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *283*, 2029–2037.
- Peng, X., Zhang, C., Alkayed, N.J., Harder, D.R., and Koehler, R.C. (2004). Dependency of Cortical Functional Hyperemia to Forepaw Stimulation on Epoxygenase and Nitric Oxide Synthase Activities in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *24*, 509–517.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* *443*, 700–704.
- Pérez-Cerdá, F., Sánchez-Gómez, M.V., and Matute, C. (2015). Pío del Río hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front. Neuroanat.* *9*, 7–12.
- Perrenoud, Q., Rossier, J., Férézou, I., Geoffroy, H., Gallopin, T., Vitalis, T., and Rancillac, A. (2012). Activation of cortical 5-HT3 receptor-expressing interneurons induces NO mediated vasodilatations and NPY mediated vasoconstrictions. *Front. Neural Circuits* *6*, 1–13.
- Perrenoud, Q., Rossier, J., Geoffroy, H., Vitalis, T., and Gallopin, T. (2013). Diversity of gabaergic interneurons in

- layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* 23, 423–441.
- Peters, A., and Harriman, K.M. (1988). Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 267, 409–432.
- Petersen, C.C.H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339–355.
- Pinto, D.J., Hartings, J.A., Brumberg, J.C., and Simons, D.J. (2003). Cortical damping: Analysis of thalamocortical response transformations in rodent barrel cortex. *Cereb. Cortex* 13, 33–44.
- Piquet, J., Toussay, X., Hepp, R., Lerchundi, R., Le Douce, J., Faivre, É., Guiot, E., Bonvento, G., and Cauli, B. (2018). Supragranular Pyramidal Cells Exhibit Early Metabolic Alterations in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–16.
- Platt, S.R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease - A review. *Vet. J.* 173, 278–286.
- Pocivavsek, A., Wu, H.Q., Potter, M.C., Elmer, G.I., Pellicciari, R., and Schwarcz, R. (2011). Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology* 36, 2357–2367.
- Porter, J.T., Cauli, B., Staiger, J.F., Lambolez, B., Rossier, J., and Audinat, E. (1998). Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3617–3628.
- Puetz, S., Lubomirov, L.T., and Pfitzer, G. (2009). Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology* 24, 342–356.
- Quistorff, B., Secher, N.H., and Van Lieshout, J.J. (2008). Lactate fuels the human brain during exercise. *FASEB J.* 22, 3443–3449.
- Raichle, M.E. (2015). The Brain's Default Mode Network. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 433–447.
- Raichle, M.E., and Mintun, M.A. (2006). Brain work and brain imaging. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 449–476.
- Raichle, M.E., MacLeod, A.M., Snyder, A.Z., Powers, W.J., Gusnard, D.A., and Shulman, G.L. (2001). A default mode of brain function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 676–682.
- Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du système Nerveux de l'Homme et des vertébrés.*
- Rancillac, A., Rossier, J., Guille, M., Tong, X.-K., Geoffroy, H., Amatore, C., Arbault, S., Hamel, E., and Cauli, B. (2006). Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J. Neurosci.* 26, 6997–7006.
- Reimer, R.J. (2013). SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 350–359.
- Reyes, A., Lujan, R., Rozov, A., Burnashev, N., Somogyi, P., and Sakmann, B. (1998). Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat. Neurosci.* 1, 279–284.
- Rock, C., Zurita, H., Lebby, S., Wilson, C.J., and Apicella, A.J. (2018). Cortical Circuits of Callosal GABAergic Neurons. *Cereb. Cortex* 28, 1154–1167.
- Roggendorf, W., and Cervós-Navarro, J. (1977). Ultrastructure of arterioles in the cat brain. *Cell Tissue Res.* 178, 495–515.
- Roy, C.S., and Sherrington, C.S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J. Physiol.* 11, 85–158.
- Sagher, O., Zhang, X.-Q., Szeto, W., Thai, Q.A., Jin, Y., Kassell, N.F., and Lee, K.S. (1993). Live computerized videomicroscopy of cerebral microvessels in brain slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 676–682.
- Sakadžić, S., Mandeville, E.T., Gagnon, L., Musacchia, J.J., Yaseen, M.A., Yucel, M.A., Lefebvre, J., Lesage, F., Dale, A.M., Eikermann-Haerter, K., et al. (2014). Large arteriolar component of oxygen delivery implies a safe margin of oxygen supply to cerebral tissue. *Nat. Commun.* 5, 5734.
- Sandrone, S., Bacigaluppi, M., Galloni, M.R., Cappa, S.F., Moro, A., Catani, M., Filippi, M., Monti, M.M., Perani,

- D., and Martino, G. (2014). Weighing brain activity with the balance: Angelo Mosso's original manuscripts come to light. *Brain* 137, 621–633.
- Sang, N., Zhang, J., Marcheselli, V., Bazan, N.G., and Chen, C. (2005). Postsynaptically Synthesized Prostaglandin E2 (PGE2) Modulates Hippocampal Synaptic Transmission via a Presynaptic PGE2 EP2 Receptor. *J. Neurosci.* 25, 9858–9870.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., and Stevens, B. (2013). The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61, 24–36.
- Schmidt, C.F., and Hendrix, J.P. (1938). The Action of Chemical Substances on the Cerebral Circulation. *Am. J. Med. Sci.* 195, 427.
- Schuster, V.L. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 633–647.
- Scott, N.A., and Murphy, T.H. (2012). Hemodynamic responses evoked by neuronal stimulation via channelrhodopsin-2 can be independent of intracortical glutamatergic synaptic transmission. *PLoS One* 7, 1–10.
- Sejnowski, T.J., Churchland, P.S., and Movshon, J.A. (2014). Putting big data to good use in neuroscience. *Nat. Neurosci.* 17, 1440–1441.
- Shen, Z., Lu, Z., Chhatbar, P.Y., O'Herron, P., and Kara, P. (2012). An artery-specific fluorescent dye for studying neurovascular coupling. *Nat. Methods* 9, 273–276.
- Shmuel, A., Yacoub, E., Pfeuffer, J., Moortele, P. Van De, Adriany, G., Hu, X., Ugurbil, K., Van de Moortele, P.F., Adriany, G., Hu, X., et al. (2002). Sustained negative BOLD, blood flow and oxygen consumption response and its coupling to the positive response in the human brain. *Neuron* 36, 1195–1210.
- Shmuel, A., Augath, M., Oeltermann, A., and Logothetis, N.K. (2006). Negative functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey visual area V1. *Nat. Neurosci.* 9, 569–577.
- Silver, I.A., and Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: Continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J. Neurosci.* 14, 5068–5076.
- Simon, A., Oláh, S., Molnár, G., Szabadics, J., and Tamás, G. (2005). Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *J. Neurosci.* 25, 6278–6285.
- Sloan, T.B. (2002). Anesthetics and the brain. *Anesthesiol. Clin. North America* 20, 265–292.
- Smith, S.E., Chen, X., Brier, L.M., Bumstead, J.R., Rensing, N.R., Ringel, A.E., Shin, H., Oldenborg, A., Crowley, J.R., Bice, A.R., et al. (2020). Astrocyte deletion of $\alpha 2$ -Na/K ATPase triggers episodic motor paralysis in mice via a metabolic pathway. *Nat. Commun.* 11.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702.
- Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-silla, A., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., Chang, E., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply. *Nature* 555, 377–381.
- Sperling, R.A., LaViolette, P.S., O'Keefe, K., O'Brien, J., Rentz, D.M., Pihlajamaki, M., Marshall, G., Hyman, B.T., Selkoe, D.J., Hedden, T., et al. (2009). Amyloid Deposition Is Associated with Impaired Default Network Function in Older Persons without Dementia. *Neuron* 63, 178–188.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 206–221.
- Stobart, J.L.L., Lu, L., Anderson, H.D.I., Mori, H., and Anderson, C.M. (2013). Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3149–3154.
- Sweeney, M.D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A.R., and Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier: From

physiology to disease and back. *Physiol. Rev.* *99*, 21–78.

Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* *9*, 260–267.

Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Lovatt, D., Hansen, A.J., Kasischke, K.A., and Nedergaard, M. (2007). Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat. Neurosci.* *10*, 754–762.

Takei, S., Hasegawa-Ishii, S., Uekawa, A., Chiba, Y., Umegaki, H., Hosokawa, M., Woodward, D.F., Watanabe, K., and Shimada, A. (2012). Immunohistochemical demonstration of increased prostaglandin F₂ levels in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* *218*, 295–304.

Tamas, G. (2003). Identified Sources and Targets of Slow Inhibition in the Neocortex. *Science (80-.)*. *299*, 1902–1905.

Tamás, G., Szabadics, J., Lörincz, A., and Somogyi, P. (2004). Input and frequency-specific entrainment of postsynaptic firing by IPSPs of perisomatic or dendritic origin. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2681–2690.

Tang, E.H.C., Jensen, B.L., Skott, O., Leung, G.P.H., Feletou, M., Man, R.Y.K., and Vanhoutte, P.M. (2008). The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E₂ in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* *78*, 130–138.

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N.T., Kim, T.K.T.T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B.B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., et al. (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat. Neurosci. advance on*, 1–37.

Thorin-Trescases, N., and Bevan, J.A. (1998). High levels of myogenic tone antagonize the dilator response to flow of small rabbit cerebral arteries. *Stroke* *29*, 1194–1201.

Tomioaka, R., and Rockland, K.S. (2007). Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J. Comp. Neurol.* *505*, 526–538.

Tran, C.H.T., George, A.G., Teskey, G.C., and Gordon, G.R. (2020). Seizures elevate gliovascular unit Ca²⁺ and cause sustained vasoconstriction. *JCI Insight* *5*.

Traystman, R.J. (2017). Cerebrovascular Anatomy and Hemodynamics. *Prim. Cerebrovasc. Dis. Second Ed.* 5–12.

Tsai, P.S., Kaufhold, J.P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P.J., Karten, H.J., Lyden, P.D., and Kleinfeld, D. (2009). Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J. Neurosci.* *29*, 14553–14570.

Tuor, U.I., Kelly, P.A.T., Edvinsson, L., and McCulloch, J. (1990). Neuropeptide Y and the Cerebral Circulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *10*, 591–601.

Uhlírova, H., Kılıç, K., Tian, P., Thunemann, M., Desjardins, M., Saisan, P.A., Sakadžić, S., Ness, T. V., Mateo, C., Cheng, Q., et al. (2016). Cell type specificity of neurovascular coupling in cerebral cortex. *Elife* *5*, 1–23.

Uekawa, M., Tomita, Y., Toriumi, H., Osada, T., Masamoto, K., Kawaguchi, H., Izawa, Y., Itoh, Y., Kanno, I., Suzuki, N., et al. (2019). Spatiotemporal dynamics of red blood cells in capillaries in layer I of the cerebral cortex and changes in arterial diameter during cortical spreading depression and response to hypercapnia in anesthetized mice. *Microcirculation* *26*.

Vanhoutte, P.M., and Mombouli, J. V. (1996). Vascular endothelium: Vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *39*, 229–238.

Vazquez-Tello, A., Fan, L., Hou, X., Joyal, J.S., Mancini, J.A., Quiniou, C., Clyman, R.I., Gobeil, F., Varma, D.R., and Chemtob, S. (2004). Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E₂ synthases and cyclooxygenases in the brain. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *287*, 1155–1163.

Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* *98*, 239–389.

Voutsinos-Porche, B., Knott, G., Tanaka, K., Quairiaux, C., Welker, E., and Bonvento, G. (2003a). Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* *13*, 1110–1121.

- Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Steiner, P., Welker, E., Chatton, J.Y., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003b). Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37, 275–286.
- Vysniauskiene, I., Allemann, R., Flammer, J., and Haefliger, I.O. (2006). Vasoactive responses of U46619, PGF2 α , latanoprost, and travoprost in isolated porcine ciliary arteries. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 295–298.
- Waite, P.M.E. (2004). *Trigeminal Sensory System* (Elsevier, Inc.).
- Wang, H., Hitron, I.M., Iadecola, C., and Pickel, V.M. (2005). Synaptic and Vascular Associations of Neurons Containing Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide Synthase in Rat Somatosensory Cortex. 2.
- Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., and Markram, H. (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J. Physiol.* 561, 65–90.
- Ward, M.E., Yan, L., Kelly, S., and Angle, M.R. (2000). Flow modulation of pressure-sensitive tone in rat pial arterioles. *Anesthesiology* 93, 1456–1464.
- Whitesell, J.D., Liska, A., Coletta, L., Hirokawa, K.E., Bohn, P., Williford, A., Groblewski, P.A., Graddis, N., Kuan, L., Knox, J.E., et al. (2021). Regional, Layer, and Cell-Type-Specific Connectivity of the Mouse Default Mode Network. *Neuron* 109, 545-559.e8.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. a, Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17513–17518.
- Williams, L.R., and Leggett, R.W. (1989). Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* 10, 187–217.
- Wolf, T., Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1997). Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res.* 761, 290–299.
- Woodward, D.F., Jones, R.L., and Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacol. Rev.* 63, 471–538.
- Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17, 205–242.
- Woolsey, T.A., Rovainen, C.M., Cox, S.B., Henegar, M.H., Liang, G.E., Liu, D., Moskalenko, Y.E., Sui, J., and Wei, L. (1996). Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: Response elements for imaging the brain. *Cereb. Cortex* 6, 647–660.
- Xing, C.Y., Tarumi, T., Liu, J., Zhang, Y., Turner, M., Riley, J., Tinajero, C.D., Yuan, L.J., and Zhang, R. (2017). Distribution of cardiac output to the brain across the adult lifespan. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 2848–2856.
- Xu, H., Jeong, H.Y., Tremblay, R., and Rudy, B. (2013). Neocortical Somatostatin-Expressing GABAergic Interneurons Disinhibit the Thalamorecipient Layer 4. *Neuron* 77, 155–167.
- Yaksh, T.L., Wang, J.Y., and Go, V.L.W. (1987). Cortical vasodilatation produced by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and by physiological stimuli in the cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 315–326.
- Yamada, J., and Jinno, S. (2013). Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J. Comp. Neurol.* 521, 1184–1201.
- Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., and Worley, P.F. (1993). Expression of a Mitogen-Inducible Cyclooxygenase in Brain Neurons : Regulation by Synaptic Activity and Glucocorticoids. *Neuron* 11, 371–386.
- Yang, J.H., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, M.O., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., et al. (2010). Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for l-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *J. Biol. Chem.* 285,

41380–41390.

Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., et al. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* (80-.). 347, 1138–1142.

Zhang, D.Y., and Raichle, M.E. (2010). Disease and the brain's dark energy. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 15–28.

Zhang, E.T., Inman, C.B., and Weller, R.O. (1990). Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J. Anat.* 170, 111–123.

Zhou, N., Gordon, G.R.J., Feighan, D., and MacVicar, B.A. (2010). Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cereb. Cortex* 20, 2614–2624.

Zielinski, M.R., Atochin, D.N., McNally, J.M., McKenna, J.T., Huang, P.L., Strecker, R.E., and Gerashchenko, D. (2019). Somatostatin+/nNOS+ neurons are involved in delta electroencephalogram activity and cortical-dependent recognition memory. *Sleep* 42, 1–16.

Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 57, 178–201.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50.

Zott, B., Simon, M.M., Hong, W., Unger, F., Chen-Engerer, H.-J., Frosch, M.P., Sakmann, B., Walsh, D.M., and Konnerth, A. (2019). A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science* (80-.). 365, 559–565.

Travaux annexes

Lactate is a major energy substrate for cortical neurons and enhances their firing activity

Anastassios Karagiannis¹, Thierry Gallopin², Alexandre Lacroix¹, Fabrice Plaisier¹, Juliette Piquet¹, H el ene Geoffroy², R egine Hepp¹, J er emie Naud e¹, Benjamin Le Gac¹, Richard Egger³, Bertrand Lambolez¹, Dongdong Li¹, Jean Rossier^{1,2}, Jochen F. Staiger⁴, Hiromi Imamura⁵, Susumu Seino⁶, Jochen Roeper³ and Bruno Cauli^{1*}

Article en soumission

¹ Sorbonne Universit e, CNRS, INSERM, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS-IBPS), 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France.

² Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

³ Institute of Neurophysiology, Goethe University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Germany.

⁴ Institute for Neuroanatomy, University Medical Center Göttingen, Georg-August-University Göttingen, 37075 Göttingen, Germany.

⁵ Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan.

⁶ Division of Molecular and Metabolic Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan.

*Correspondence: bruno.cauli@upmc.fr

1 **Lactate is a major energy substrate for cortical neurons and enhances their**
2 **firing activity.**

3 Anastassios Karagiannis¹, Thierry Gallopin², Alexandre Lacroix¹, Fabrice Plaisier¹,
4 Juliette Piquet¹, H el ene Geoffroy², R egine Hepp¹, J er emie Naud e¹, Benjamin Le
5 Gac¹, Richard Egger³, Bertrand Lambolez¹, Dongdong Li¹, Jean Rossier^{1,2}, Jochen F.
6 Staiger⁴, Hiromi Imamura⁵, Susumu Seino⁶, Jochen Roeper³ and Bruno Cauli^{1*}.

7

8 1. Sorbonne Universit e, CNRS, INSERM, Neurosciences Paris Seine - Institut de
9 Biologie Paris Seine (NPS-IBPS), 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France.

10 2. Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue
11 Vauquelin, 75005 Paris, France.

12 3. Institute of Neurophysiology, Goethe University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7,
13 60590 Frankfurt, Germany.

14 4. Institute for Neuroanatomy, University Medical Center Göttingen, Georg-August-
15 University Göttingen, 37075 Göttingen, Germany.

16 5. Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan.

17 6. Division of Molecular and Metabolic Medicine, Kobe University Graduate School of
18 Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan.

19

20

21

22

23

24

25 *Correspondence: bruno.cauli@upmc.fr

1 **Summary**

2 Glucose is the mandatory fuel for the brain, yet the relative contribution of glucose
3 and lactate for neuronal energy metabolism is unclear. We found that increased
4 lactate, but not glucose concentration, enhances the spiking activity of neurons of the
5 cerebral cortex. Enhanced spiking was dependent on ATP-sensitive potassium (K_{ATP})
6 channels formed with Kir6.2 and SUR1 subunits, which we show are functionally
7 expressed in most neocortical neuronal types. We also demonstrate the ability of
8 cortical neurons to take-up and metabolize lactate. We further reveal that ATP is
9 produced by cortical neurons largely via oxidative phosphorylation and only modestly
10 by glycolysis. Our data demonstrate that in active neurons, lactate is preferred to
11 glucose as an energy substrate, and that lactate metabolism shapes neuronal activity
12 in the neocortex through K_{ATP} channels. Our results highlight the importance of
13 metabolic crosstalk between neurons and astrocytes for brain function.

14

15 **Keywords**

16 K_{ATP} channel, pyramidal cell, interneuron, glucose, single cell RT-PCR, ATP.

17

18 **Highlights**

- 19
- Most cortical neurons subtypes express pancreatic beta-cell like K_{ATP}

20 channels.

 - Lactate enhances spiking activity via its uptake and closure of K_{ATP} channels.

21

 - Cortical neurons take up and oxidize lactate.

22

 - Cortical neurons produce ATP mainly by oxidative phosphorylation.

23

24

1 **Introduction**

2 The human brain represents 2% of the body mass, yet it consumes about 20% of
3 blood oxygen and glucose which are mandatory energy substrates (Clarke and
4 Sokoloff, 1999). The majority (~50-80%) of the cerebral energy metabolism is
5 believed to be consumed by the Na⁺/K⁺ ATPase pump to maintain cellular ionic
6 gradients dissipated during synaptic transmission and action potentials (Attwell and
7 Laughlin, 2001;Lennie, 2003). Synaptic and spiking activities are also coupled with
8 local cerebral blood flow and glucose uptake (Devor et al., 2008;Logothetis, 2008).
9 This process, referred to as neurovascular and neurometabolic coupling, is the
10 physiological basis of brain imaging techniques (Raichle and Mintun, 2006) and
11 maintains extracellular glucose within a physiological range of 2-3 mM (Silver and
12 Erecinska, 1994;Hu and Wilson, 1997b). Also, following increased neuronal activity
13 extracellular lactate increases (Prichard et al., 1991;Hu and Wilson, 1997a) for
14 several minutes up to twice of its 2-5 mM basal concentration despite oxygen
15 availability (Magistretti and Allaman, 2018).

16

17 Based on the observations that various by-products released during glutamatergic
18 transmission stimulate astrocyte glucose uptake, aerobic glycolysis and lactate
19 release (Pellerin and Magistretti, 1994;Voutsinos-Porche et al., 2003;Ruminot et al.,
20 2011;Choi et al., 2012;Sotelo-Hitschfeld et al., 2015;Lerchundi et al., 2015), lactate
21 has been proposed to be shuttled from astrocytes to neurons to meet neuronal
22 energy needs. This hypothesis is supported by the existence of a lactate gradient
23 between astrocytes and neurons (Machler et al., 2016), the preferential use of lactate
24 as an energy substrate in cultured neurons (Bouzier-Sore et al., 2003;Bouzier-Sore
25 et al., 2006), and its ability to support neuronal activity during glucose shortage
26 (Schurr et al., 1988;Rouach et al., 2008;Wyss et al., 2011;Choi et al., 2012).
27 However, the use of different fluorescent glucose analogues to determine whether
28 astrocytes or neurons take up more glucose during sensory-evoked neuronal activity
29 has led to contradicting results (Chuquet et al., 2010;Lundgaard et al., 2015).
30 Furthermore brain slices and *in vivo* evidence have indicated that synaptic and
31 sensory stimulation enhanced neuronal glycolysis and potentially lactate release by
32 neurons (Ivanov et al., 2014;Diaz-Garcia et al., 2017), thereby challenging the
33 astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. Hence, the relative contribution of
34 glucose and lactate to neuronal ATP synthesis remains unresolved.

1 ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) act as metabolic sensors controlling
2 various cellular functions (Babenko et al., 1998). Their open probability (P_o) is
3 regulated by the energy charge of the cell (*i.e.* the ATP/ADP ratio). While ATP
4 mediates a tonic background inhibition of K_{ATP} channels, cytosolic increases of ADP
5 concentrations that occur as a sequel to enhanced energy demands, increase the P_o
6 of K_{ATP} channels. In neurons, electrical activity is accompanied by enhanced sodium
7 influx, which in turn activates the Na^+/K^+ ATPase. Activity of this pump alters the
8 submembrane ATP/ADP ratio sufficiently to activate K_{ATP} channels (Tanner et al.,
9 2011). The use of fluorescent ATP/ADP biosensors has demonstrated that K_{ATP}
10 channels are activated ($P_o > 0.1$) when ATP/ADP ratio is ≤ 5 (Tantama et al., 2013).

11
12 K_{ATP} channels are heterooctamers composed of four inwardly rectifying K^+ channel
13 subunits, Kir6.1 or Kir6.2, and four sulfonylurea receptors, SUR1 or SUR2, the later
14 existing in two splice variants (SUR2A and SUR2B) (Sakura et al., 1995; Aguilar-
15 Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995b; Isomoto et al., 1996; Inagaki et al.,
16 1996; Chutkow et al., 1996; Yamada et al., 1997; Li et al., 2017; Martin et al., 2017; Lee
17 et al., 2017; Puljung, 2018). The composition in K_{ATP} channel subunits confers
18 different functional properties, pharmacological profiles as well as metabolic
19 sensitivities (Isomoto et al., 1996; Inagaki et al., 1996; Gribble et al., 1997; Yamada et
20 al., 1997; Okuyama et al., 1998; Liss et al., 1999). K_{ATP} channel subunits are
21 expressed in the neocortex (Ashford et al., 1988; Karschin et al., 1997; Dunn-Meynell
22 et al., 1998; Thomzig et al., 2005; Cahoy et al., 2008; Zeisel et al., 2015; Tasic et al.,
23 2016) and have been shown to protect cortical neurons from ischemic injury (Heron-
24 Milhavet et al., 2004; Sun et al., 2006) and to modulate their excitability (Gimenez-
25 Cassina et al., 2012) and intrinsic firing activity (Lemak et al., 2014). K_{ATP} channels
26 could thus be leveraged to decipher electrophysiologically the relative contribution of
27 glucose and lactate to neuronal ATP synthesis. Here, we apply single-cell RT-PCR
28 (scRT-PCR) to identify the mRNA subunit composition of K_{ATP} channel across
29 different neocortical neuron subtypes and demonstrate lactate as the preferred
30 energy substrate that also enhances firing activity.

31

1 **Results**

2 **Expression of K_{ATP} channel subunits in identified cortical neurons**

3 We first sought to determine whether K_{ATP} channel subunits were expressed in
4 different neuronal subtypes from the neocortex. Neurons (n=277) of the juvenile rat
5 barrel cortex from layers I to IV (Table S1) were functionally and molecularly
6 characterized in acute slices by scRT-PCR (Figure 1), whose sensitivity was
7 validated from 500 pg of total cortical RNAs (Figure S1A). Neurons were segregated
8 into 7 different subtypes according to their overall molecular and electrophysiological
9 similarity (Figure 1A) using unsupervised Ward's clustering (Ward, 1963), an
10 approach we previously successfully used to classify cortical neurons (Cauli et al.,
11 2000; Gallopin et al., 2006; Karagiannis et al., 2009). Regular spiking (RS, n=63) and
12 intrinsically bursting (IB, n=10) cells exhibited the molecular characteristics of
13 glutamatergic neurons, with very high single-cell detection rate (n=69 of 73, 95%) of
14 vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1) and low detection rate (n=7 of 73, 10%) of
15 glutamic acid decarboxylases (GADs, Figure 1B-E and Table S2), the GABA
16 synthesizing enzymes. This group of glutamatergic neurons distinctly displayed
17 hyperpolarized resting membrane potential (-81.2 ± 0.8 mV), possessed a large
18 membrane capacitance (108.6 ± 3.6 pF), discharged with wide action potentials (1.4
19 ± 0.0 ms) followed by medium afterhyperpolarizations (mAHs). These neurons did
20 sustain only low maximal frequencies (35.4 ± 1.6 Hz) and showed complex spike
21 amplitude accommodation (Table S3-7). In contrast to RS neurons, IB neurons were
22 more prominent in deeper layers (Table S1) and their bursting activity affected their
23 adaptation amplitudes and kinetics (Figure 1C and Tables S4-5), spike broadening
24 (Figure 1C and Tables S6) and the shape of mAHs (Figure 1C and Tables S7).

25 All other neuronal subtypes were characterized by a high single-cell detection rate of
26 GAD65 and/or GAD67 mRNA (n=202 of 204, 99%, Figure 1B and Table S2) and
27 therefore likely corresponded to GABAergic interneurons. Among GAD-positive
28 population, neurons frequently expressed mRNA for vasoactive intestinal polypeptide
29 (VIP), and in accordance to their electrophysiological phenotypes, were segregated
30 into Bursting VIP (n=27) and Adapting VIP (n=59) neurons. These VIP interneurons
31 were further characterized by high membrane resistance (581 ± 27 M Ω) and small
32 membrane capacitance (52.7 ± 2.3 pF, Figure 1B-C and Tables S2-3).

33 Other GABAergic interneurons co-expressed somatostatin (SOM) and calbindin (CB)
34 as well as neuropeptide Y (NPY) to a lesser extent and functionally corresponded to

1 Adapting SOM neurons (n=24, Figure 1B and Table S2). They displayed depolarized
2 resting membrane potential, pronounced voltage sags, low rheobases and
3 pronounced afterdepolarizations (Figure 1C and Table S3-6). In another group of
4 GABAergic adapting interneurons located in superficial layers, mRNA for NPY was
5 detected at a high rate (n=31 of 56, 55%). In these Adapting NPY interneurons
6 mRNA for nitric oxide synthase-1 (NOS-1) was detected at a lower rate (Figure 1B
7 and Tables S1-2). In response to suprathreshold depolarizing current steps, these
8 interneurons showed very little spike frequency adaptation (Figure 1C and Table S4).
9 Finally, parvalbumin (PV) was observed in virtually all neurons of a subpopulation
10 termed Fast Spiking-PV interneurons (FS-PV, n=37 of 38, 97%, Figure 1B and Table
11 S2). In comparison to all other cortical neurons described above, they were
12 characterized by low membrane resistance ($201 \pm 13 \text{ M}\Omega$), fast time constant, high
13 rheobase, very short spikes ($0.6 \pm 0.0 \text{ ms}$) with sharp fast afterhyperpolarizations
14 (fAHs) and the ability to sustain high firing rates ($139.9 \pm 6.8 \text{ Hz}$) with little to no
15 frequency adaptation (Figure 1C and Tables S3-7). These data thus identified
16 different neuronal subtypes based on their distinctive electrophysiological and
17 molecular features (Ascoli et al., 2008) confirming our previous classification
18 schemes (Cauli et al., 2000; Gallopin et al., 2006; Karagiannis et al., 2009).

19 The functional and molecular classification of cortical neurons allowed us to probe for
20 the single-cell expression of mRNA for K_{ATP} channel subunits in well defined
21 subpopulations. We observed consistent expression of Kir6.2 and SUR1 between the
22 different cortical neuronal subtypes (Figure 1D-F). Although the scRT-PCR
23 procedure was shown to be reliable for co-detecting all K_{ATP} channel subunits from
24 low amounts of total cortical RNAs (Figure S1A), the overall single-cell detection
25 rates were low for Kir6.2 (n=63 of 248, 25%) and SUR1 (n=28 of 277, 10%). In
26 accordance to previous single-cell studies (Liss et al., 1999; Zeisel et al., 2015; Tasic
27 et al., 2016), our observation suggests an expression at a low copy number at the
28 single-cell level. Apart from a single Adapting NPY neuron (Figure 1D), where Kir6.1
29 mRNA was detected, our data set provide evidence that for all neocortical neuron
30 types the pattern of detected K_{ATP} channels mRNA expression suggested the co-
31 expression Kir6.2 and SUR1 subunits. This implies that most cortical neurons might
32 be endowed with a pancreatic beta-cell like K_{ATP} channel, which might operate as a
33 metabolic sensor. We next tested this prediction with functional recordings of K_{ATP}
34 channel-mediated whole-cell currents in neocortical neurons.

1 **Characterization of K_{ATP} channels in cortical neurons**

2 To assess whether K_{ATP} channels are functional in identified cortical neurons ($n=18$,
3 Figure 2A), we measured the effects of different K_{ATP} channel modulators on whole-
4 cell currents ($Q_{(3,18)}=32.665$, $p=3.8 \times 10^{-7}$, Friedman test) and membrane resistances
5 ($Q_{(3,18)}=40.933$, $p=6.8 \times 10^{-9}$). Pinacidil (100 μ M), a SUR2-preferring K_{ATP} channel
6 opener (Inagaki et al., 1996;Moreau et al., 2005), had little or no effect on current (4.1
7 ± 3.7 pA, $p=0.478$) and membrane resistance (-9.6 ± 3.7 %, $p=0.121$, Figure 2B-C).
8 By contrast, diazoxide (300 μ M), an opener acting on SUR1 and SUR2B-containing
9 K_{ATP} channels (Inagaki et al., 1996;Moreau et al., 2005), consistently induced an
10 outward current (45.0 ± 9.6 pA, $p=4.8 \times 10^{-5}$) and a decrease in membrane
11 resistance ($-34.5 \pm 4.3\%$, $p=3.6 \times 10^{-5}$) indicative of the activation of a hyperpolarizing
12 conductance (Figure 2B-C). The sulfonylurea tolbutamide (500 μ M, Figure 2B-C), a
13 K_{ATP} channel blocker (Ammala et al., 1996;Isomoto et al., 1996;Gribble et al.,
14 1997;Isomoto and Kurachi, 1997), did not change whole-cell basal current (-6.6 ± 3.0
15 pA, $p=0.156$) or membrane resistance ($20.5 \pm 7.5\%$, $p=3.89 \times 10^{-2}$). Conversely,
16 tolbutamide dramatically reversed diazoxide effects on both current ($p=4.1 \times 10^{-8}$)
17 and membrane resistance ($p=5.8 \times 10^{-10}$).

18
19 In virtually all neuronal subtypes ($H_{(6,43)}=2.274$, $p=0.810$, Kruskal–Wallis H test) or
20 groups ($t_{(42)}=0.3395$, $p=0.736$, Student's t-test), the diazoxide-tolbutamide
21 current/voltage relationship reversed very close to the theoretical potassium
22 equilibrium potential ($E_K=-106.0$ mV, Figure 2D-F) confirming the opening of a
23 selective potassium conductance. Besides its effects on plasma membrane K_{ATP}
24 channels, diazoxide is also a mitochondrial uncoupler (Drose et al., 2006) which
25 increases reactive oxygen species (ROS) production. This might stimulate Ca^{2+}
26 sparks and large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels (Xi et al., 2005)
27 leading to potential confounding effects. This possibility was ruled out by the
28 observation that Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP, 25 μ M), a
29 ROS scavenger (D'Agostino et al., 2007), did not reduce the diazoxide-tolbutamide
30 responses on current ($t_{(10)}=0.76559$, $p=0.462$, Figure S2A,B) and conductance
31 ($t_{(10)}=1.24758$, $p=0.241$, Figure S2A,C).

32
33 Cortical neurons exhibited K_{ATP} conductances of similar value between their subtypes
34 ($H_{(6,63)}=5.6141$, $p=0.468$) or groups ($U_{(9,54)}=233$, $p=0.855$, Mann–Whitney U test,

1 Figures S3A,B). K_{ATP} channels activated by diazoxide essentially doubled the whole
2 cell conductance in the subthreshold membrane potential compared to control or
3 tolbutamide conditions, regardless of neuronal subtypes ($H_{(6,63)}=5.4763$, $p=0.484$) or
4 groups ($t_{(61)}=1.324$, $p=0.191$, Figures 2G,H). Also, K_{ATP} current density was similar
5 ($H_{(6,63)}=4.4769$, $p=0.612$, $U_{(9,54)}=240.5$, $p=0.965$, Figures S3C,D). Together with the
6 pinacidil unresponsiveness, these data indicate that the large majority of cortical
7 neurons expressed functional SUR1-mediated K_{ATP} channels in a homogeneous
8 fashion across different subpopulations. To confirm that Kir6.2 is the pore-forming
9 subunit of K_{ATP} channels in cortical neurons, we used a genetic approach based on
10 Kir6.2 knock-out mice (Miki et al., 1998). We first verified the expression of Kir6.2 and
11 SUR1 subunits in pyramidal cells from wild type mice by scRT-PCR (Figure 3A,B).
12 We next used a dialysis approach by recording neurons with an ATP-free pipette
13 solution (Miki et al., 2001) enriched in sodium (20 mM) to stimulate submembrane
14 ATP depletion and ADP production by the Na^+/K^+ ATPase, which is known to activate
15 K_{ATP} channels (Figure 3H). We confirmed that ATP1a1 and ATP1a3 (Figure 3B) were
16 the main α -subunits of the Na^+/K^+ ATPase pump in pyramidal neurons (Zeisel et al.,
17 2015; Tasic et al., 2016). Dialysis of ATP-free/20 mM Na^+ -pipette solution indeed
18 induced a standing outward current in Kir6.2^{+/+} neurons within 5 minutes (46.7 ± 19.0
19 pA at -50 mV, $n=26$) that was reversing close to E_K (Figure 3C,E). In contrast, this
20 current was not observed in Kir6.2^{-/-} neurons (-59.9 ± 11.9 pA, $n=22$, $U_{(26,22)}=78$,
21 $p=2.4221 \times 10^{-6}$, one-tailed, Figure 3D-G). Collectively, these data show that cortical
22 neurons predominately express functional K_{ATP} channels composed of Kir6.2 and
23 SUR1 subunits.

24

25 **Modulation of neuronal excitability and activity by K_{ATP} channel**

26 Despite their large diversity, cortical neurons display a homogenous functional
27 expression of K_{ATP} channels, questioning how these channels integrate the metabolic
28 environment to adjust neuronal activity. To address this question, we first evaluated
29 in identified cortical neurons ($n=39$) the ability of K_{ATP} channels to modulate neuronal
30 excitability, notably by measuring membrane potentials ($Q_{(2,39)}=38.000$, $p=5.6 \times 10^{-9}$)
31 and membrane resistances ($Q_{(2,39)}=40.205$, $p=1.9 \times 10^{-9}$), as well as spiking activity
32 ($Q_{(2,39)}=28.593$, $p=6.2 \times 10^{-7}$). Following electrophysiological identification, the K_{ATP}
33 channel blocker tolbutamide was applied, which resulted in a slight depolarization
34 ($\Delta V_m=2.6 \pm 0.8$ mV, $p=1.74 \times 10^{-2}$, Figure 4A,D) and increase in membrane

1 resistance ($\Delta R_m = 78 \pm 32 \text{ M}\Omega$, $p = 1.52 \times 10^{-3}$, Figure 4B,E). These effects were strong
2 enough to trigger and stimulate the firing of action potentials ($\Delta F = 0.3 \pm 0.2 \text{ Hz}$, $p =$
3 9.21×10^{-3} , Figure 4A,C,F). By contrast, diazoxide hyperpolarized cortical neurons ($-$
4 $4.0 \pm 0.6 \text{ mV}$, $p = 1.87 \times 10^{-4}$, Figure 4A,D), decreased their membrane resistance (-39
5 $\pm 23 \text{ M}\Omega$, $p = 1.52 \times 10^{-3}$, Figure 4B,E) but did alter their rather silent basal spiking
6 activity ($-0.1 \pm 0.1 \text{ Hz}$, $p = 0.821$, Figure 4A,C,F).

7
8 Most cortical neurons ($n = 32$ of 39) showed modulation of neuronal excitability by
9 both K_{ATP} channel modulators and were considered to be responsive. A similar
10 proportion of responsive neurons was observed between neuronal subtypes (Figure
11 S4A, $X^2_{(5)} = 7.313$, $p = 0.1984$) or groups (Figure S4B, $p = 0.9999$, Fisher's exact test).
12 The apparent relative lack of responsiveness in FS-PV interneurons (Figure S4A),
13 despite a whole-cell K_{ATP} conductance similar to that of other neuronal types (Figure
14 S3A), is likely attributable to their low input resistance (Table S3) making K_{ATP}
15 channels less effective to change membrane potential. Overall, K_{ATP} channels
16 modulated membrane potential, resistance and firing rate by up to $7.9 \pm 0.9 \text{ mV}$, $76 \pm$
17 17% and $0.5 \pm 0.2 \text{ Hz}$, respectively. This modulation of neuronal excitability (Figure
18 4G-J) and activity (Figure S4C,D) was similar between neuronal subtypes or groups
19 (Figure 4H-J and S4C-E). Thus, K_{ATP} channels modulate the excitability and activity
20 of all subtypes of cortical neurons.

21

22 **Enhancement of neuronal activity by lactate via modulation of K_{ATP} channels**

23 The uniform expression of metabolically highly sensitive K_{ATP} channels by cortical
24 neurons suggests their ability to couple the local glycolysis capacity of astrocytes
25 with spiking activity. We therefore evaluated whether extracellular changes in
26 glucose and lactate could differentially shape the spiking activity of cortical neurons
27 through their energy metabolism and K_{ATP} channel modulation. Importantly, to
28 preserve intracellular metabolism, neurons were recorded in perforated patch-
29 configuration. Stable firing rates of about 4 Hz inducing ATP consumption by the
30 Na^+/K^+ ATPase (Attwell and Laughlin, 2001) were evoked by applying a depolarizing
31 current and continuously monitored throughout changes in extracellular medium
32 (Figure 5A, $Q_{(2,16)} = 22.625$, $p = 1.222 \times 10^{-5}$).

1 Decreasing extracellular glucose from 10 mM to a normoglycemic concentration of
2 2.5 mM (Silver and Erecinska, 1994;Hu and Wilson, 1997b) did not change firing rate
3 (Figure 5A,B, $p=0.2159$) of cortical neurons ($n=16$). By contrast, supplementing
4 extracellular 2.5 mM glucose with 15 mM lactate, a concentration observed in the
5 blood after an intense physical exercise (Quistorff et al., 2008) and corresponding to
6 the same number of carbon atoms as 10 mM glucose, roughly doubled the firing rate
7 compared to both 2.5 ($p=7.829 \times 10^{-4}$) and 10 mM glucose ($p=4.303 \times 10^{-6}$)
8 conditions. Firing rate enhancement by lactate was dose-dependent ($H_{(7,76)}=35.142$,
9 $p=1.052 \times 10^{-5}$) and reached statistical significance above 5 mM (Figure 5C). We
10 reasoned that this effect could be mediated by K_{ATP} channel closure. Indeed, the
11 increase in firing rate by lactate ($209 \pm 49\%$) was strongly reduced by the K_{ATP}
12 channel activator diazoxide ($71 \pm 18\%$, $p=3.346 \times 10^{-3}$, Figure 5D). Tolbutamide
13 reversed diazoxide's effect ($160 \pm 17\%$, $p=9.345 \times 10^{-3}$) but did not increase firing
14 rate further ($p=0.5076$). This occlusion of tolbutamide's effect by 15 mM lactate also
15 suggests that this concentration reaches saturating levels and is the highest
16 metabolic state that can be sensed by K_{ATP} channels. Enhancement of neuronal
17 activity by lactate was also observed in Kir6.2^{+/+} cortical neurons ($147 \pm 25\%$,
18 $p=2.840 \times 10^{-2}$) but not in Kir6.2^{-/-} mice ($112 \pm 32\%$, $p=0.8785$, Figure 5E). These
19 observations indicate that lactate enhances neuronal activity via a closure of K_{ATP}
20 channels (Figure 5F).

21

22 **Mechanism of lactate-sensing**

23 To determine whether lactate-sensing involves intracellular lactate oxidative
24 metabolism and/or extracellular activation of the lactate receptor GPR81, we next
25 probed the expression of monocarboxylate transporters (MCT), which allow lactate
26 uptake. Consistent with mouse RNAseq data (Zeisel et al., 2015;Tasic et al., 2016),
27 MCT1 and MCT2 were the main transporters detected in rat cortical neurons by
28 scRT-PCR, although with relatively low single cell detection rates (54 of 277, 19.5%
29 and 78 of 277, 28.2%, for MCT1 and 2, respectively, Figure 6A and S5).

30 The expression of monocarboxylate transporters in cortical neurons is compatible
31 with lactate uptake and metabolism leading to the closure of K_{ATP} channels and an
32 increase in firing rate. We thus evaluated whether lactate uptake was needed for
33 lactate-sensing. We used 250 μ M α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CIN), a
34 concentration blocking lactate uptake while only moderately altering mitochondrial

1 pyruvate carrier in brain slices (Schurr et al., 1999;Ogawa et al., 2005;Galeffi et al.,
2 2007). 4-CIN reversed the increased firing rate induced by lactate (Figure 6B, $T(9)=0$,
3 $p=7.686 \times 10^{-3}$) indicating that facilitated lactate transport is required for K_{ATP} channel
4 closure and in turn firing rate acceleration.

5 A mechanism of lactate-sensing involving an intracellular lactate oxidative
6 metabolism would also require the expression of lactate dehydrogenase (LDH), that
7 reversibly converts lactate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) to pyruvate
8 and NADH (Figure 6E, inset). We thus also probed for the expression of LDH
9 subunits. LDH-A and LDH-B were observed in a large majority of cortical neurons
10 with LDH-A being more frequent in glutamatergic neurons than in GABAergic
11 interneurons ($p=1.61 \times 10^{-2}$, Figure 6A and S5). Nonetheless, neuron subtypes
12 analysis did not allow to disclose which populations express less frequently LDH-A.
13 (Figure S5). To confirm the ability of cortical neurons to take up and oxidize lactate
14 we also visualized NADH fluorescence dynamics (Chance et al., 1962) induced by
15 bath application of lactate. Widefield somatic NADH fluorescence appeared as a
16 diffuse labeling surrounding presumptive nuclei (Figure 6D). Consistent with lactate
17 transport by MCTs and oxidization by LDH, NADH was increased under lactate
18 application ($U_{(61,67)}=196$, $p=3.1 \times 10^{-24}$, Figure 6E-F).

19 Since the lactate receptor GPR81 has been observed in the cerebral cortex
20 (Lauritzen et al., 2014), lactate-sensing might also involve this receptor. This
21 possibility was ruled out by the observation that pyruvate (15 mM), which is
22 transported by MCTs (Broer et al., 1998;Broer et al., 1999) but does not activate
23 GPR81 (Ahmed et al., 2010), enhanced firing rate to an extent similar to that of
24 lactate (Figure 6C, $U_{(16,6)}=43$, $p=0.7468$). In line with its uptake and reduction,
25 pyruvate also decreased NADH (Figure 6E-F, $U_{(44,67)}=868$, $p=2.08 \times 10^{-4}$).

26 The requirement of monocarboxylate transport and the similar effect of lactate and
27 pyruvate on neuronal activity suggest that once taken up, lactate would be oxidized
28 into pyruvate and metabolized by mitochondria to produce ATP, leading in turn to a
29 closure of K_{ATP} channels and increased firing rate. The apparent absence of glucose
30 responsiveness in cortical neurons also suggests that glycolysis contributes modestly
31 to ATP production. To determine the relative contribution of glycolysis and oxidative
32 phosphorylation to ATP synthesis, we transduced the genetically encoded
33 fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based ATP biosensor AT1.03^{YEMK}
34 (Imamura et al., 2009) using a recombinant Sindbis virus. AT1.03^{YEMK} fluorescence

1 was mostly observed in pyramidal shaped cells (Figure 6G), consistent with the
2 strong tropism of this viral vector towards pyramidal neurons (Piquet et al., 2018).
3 Blocking glycolysis with 200 μ M iodoacetic acid (IAA) decreased modestly the FRET
4 ratio by $2.9 \pm 0.2\%$ (Figure 6H, $p=2.44 \times 10^{-13}$). By contrast, adding potassium
5 cyanide (KCN, 1mM), a respiratory chain blocker, reduced the FRET ratio to a much
6 larger extent ($52.3 \pm 0.6\%$, Figure 6H, $p=2.44 \times 10^{-13}$). KCN also induced a strong
7 NADH fluorescence increase (Figure S6A-B, $U_{(12,42)}=0$, $p=5.83 \times 10^{-12}$), indicating a
8 highly active oxidative phosphorylation in cortical neurons.

1 **Discussion**

2 We report that extracellular lactate and pyruvate, but not glucose, enhance the
3 activity of cortical neurons through a mechanism involving facilitated transport and
4 the subsequent closure of K_{ATP} channels composed of Kir6.2 and SUR1 subunits.
5 ATP synthesis derives mostly from oxidative phosphorylation and weakly from
6 glycolysis in cortical neurons. Together with their ability to oxidize lactate by LDH,
7 these observations suggest that lactate is a preferred energy substrate over glucose
8 in cortical neurons. Besides its metabolic importance lactate also appears as a
9 signaling molecule enhancing firing activity (Figure 7). This suggests that an efficient
10 neurovascular and neurometabolic coupling could define a time window of an up
11 state of lactate during which neuronal activity and plasticity would be locally
12 enhanced (Suzuki et al., 2011; Jimenez-Blasco et al., 2020).

13

14 **K_{ATP} channel subunits in cortical neurons**

15 Similarly to neurons of the hippocampal formation (Zawar et al., 1999; Cunningham et
16 al., 2006; Sada et al., 2015) we found that, regardless of the neuronal type, most
17 neocortical neurons express diazoxide-sensitive, but pinacidil-insensitive K_{ATP}
18 channels (Cao et al., 2009). In agreement with this pharmacological profile (Inagaki
19 et al., 1996) and the absence of functional K_{ATP} channels in Kir6.2^{-/-} neurons, we
20 observed Kir6.2 and SUR1 subunits as the main components of K_{ATP} channels. Their
21 low detection rate is presumably due to the low copy number of their mRNAs, as
22 described in single cortical neurons from mice (Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016),
23 and making their observation by scRT-PCR challenging (Tsuzuki et al., 2001). Since
24 Kir6.2 is an intronless gene, collection of the nucleus was avoided to prevent
25 potential false positives. Thus, neurons positive for both Kir6.2 and somatostatin
26 intron, taken as an indicator of genomic DNA (Hill et al., 2007; Devienne et al., 2018),
27 were discarded from Kir6.2 expression analysis. Unavoidably, this procedure does
28 reduce the amount of cytoplasm collected, thereby decreasing the detection rate of
29 both Kir6.2 and SUR1.

30

31 Consistent with the preferred expression of Kir6.1 in mural and endothelial cells
32 (Bondjers et al., 2006; Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016; Aziz et al.,
33 2017; Vanlandewijck et al., 2018; Saunders et al., 2018), this subunit was only
34 observed in one out of 277 cortical neurons analyzed. Similarly, SUR2B, the SUR2

1 variant expressed in forebrain (Isomoto et al., 1996) and cortex (Figure S1), whose
2 presence is largely restricted to vascular cells (Zeisel et al., 2015), was not observed
3 in cortical neurons.

4 **Relative sensitivity of cortical neurons to glucose, lactate and pyruvate**

6 Consistent with previous observations (Yang et al., 1999), decreasing extracellular
7 glucose from standard slice concentrations down to a normoglycemic level did not
8 alter firing rates of cortical neurons. However, their activity is silenced during
9 hypoglycemic episodes through K_{ATP} channels activation (Yang et al., 1999;Zawar
10 and Neumcke, 2000;Molnar et al., 2014;Sada et al., 2015). This relative glucose
11 unresponsiveness is in contrast with pancreatic beta cells and hypothalamic glucose-
12 excited neurons whose activity is regulated over a wider range of glucose
13 concentrations by K_{ATP} channels also composed with Kir6.2 and SUR1 subunits
14 (Aguilar-Bryan et al., 1995;Inagaki et al., 1995a;Miki et al., 1998;Yang et al.,
15 1999;Miki et al., 2001;Tarasov et al., 2006;Varin et al., 2015). The inability of cortical
16 neurons to regulate their spiking activity at glucose levels beyond normoglycemia is
17 likely due to the lack of glucokinase, a hexokinase which catalyzes the first step of
18 glycolysis and acts as a glucose sensor in the millimolar range (German, 1993;Yang
19 et al., 1999). As earlier reported, hexokinase-1 (HK1) is the major isoform in cortical
20 neurons (Zeisel et al., 2015;Tasic et al., 2016;Piquet et al., 2018). Since this enzyme
21 has a micromolar affinity for glucose and is inhibited by its product, glucose-6-
22 phosphate (Wilson, 2003), HK1 is likely already saturated and/or inhibited during
23 normoglycemia thereby limiting glycolysis. Nonetheless, HK1 saturation/inhibition can
24 be mitigated when energy consumption is high (Attwell and Laughlin, 2001;Wilson,
25 2003;Tantama et al., 2013), and then glucose can probably modulate neuronal
26 activity via a high affinity mechanism, as evidenced by slow oscillations of spiking
27 activity involving synaptic transmission (Cunningham et al., 2006) or by the use of
28 glucose-free whole-cell patch-clamp solution (Kawamura, Jr. et al., 2010) that mimics
29 high glucose consumption (Piquet et al., 2018;Diaz-Garcia et al., 2019).

31 Similarly to glucose-excited hypothalamic neurons (Yang et al., 1999;Song and
32 Routh, 2005), but in contrast with pancreatic beta cells (Newgard and McGarry,
33 1995), cortical neurons were dose-dependently excited by lactate. This lactate
34 sensitivity is consistent with lactate transport and oxidization in hypothalamic and

1 cortical neurons (Ainscow et al., 2002;Sada et al., 2015;Diaz-Garcia et al., 2017)
2 which are low in beta cells (Sekine et al., 1994;Pullen et al., 2011). Pyruvate had a
3 similar effect to lactate in cortical neurons under normoglycemic condition whereas it
4 only maintains the activity of hypothalamic glucose-excited neurons during
5 hypoglycemia (Yang et al., 1999) and barely activates pancreatic beta cells (Dufer et
6 al., 2002). Thus, cortical neurons display a peculiar metabolic sensitivity to
7 monocarboxylates. Our data also suggest that under normoglycemic conditions a
8 portion of K_{ATP} channels are open when cortical neurons fire action potentials.

9

10 **Mechanism of lactate-sensing**

11 Our pharmacological, molecular and genetic evidence indicates that the closure of
12 K_{ATP} channels is responsible for the firing rate enhancement by lactate. Since K_{ATP}
13 channels can be modulated by G protein-coupled receptors (Kawamura, Jr. et al.,
14 2010), lactate-sensing might have been mediated by GPR81, a G_i protein-coupled
15 lactate receptor expressed in the cerebral cortex (Lauritzen et al., 2014). This
16 possibility is however unlikely since the activation of GPR81 inhibits cultured cortical
17 neurons (Bozzo et al., 2013;de Castro Abrantes H. et al., 2019) and we show here
18 that enhancing effect pyruvate on neuronal activity was similar to that of lactate,
19 although pyruvate does not activate GPR81 (Ahmed et al., 2010).

20

21 We found that lactate-sensing was critically dependent on lactate transport and we
22 confirmed the capacity of cortical neurons to take up and oxidize lactate (Bittar et al.,
23 1996;Laughton et al., 2000;Bouzier-Sore et al., 2003;Wyss et al., 2011;Choi et al.,
24 2012;Sada et al., 2015;Machler et al., 2016). LDH metabolites, including pyruvate
25 and oxaloacetate, can lead to K_{ATP} channel closure (Dhar-Chowdhury et al.,
26 2005;Sada et al., 2015) and could mediate lactate-sensing. An intermediate role of
27 oxaloacetate in lactate-sensing is compatible with enhanced Krebs cycle and
28 oxidative phosphorylation, which leads to an increased ATP/ADP ratio and the
29 closure of K_{ATP} channels (Figure 7). In contrast to oxaloacetate, intracellular ATP was
30 found to be ineffective for reverting K_{ATP} channel opening induced by LDH inhibition
31 (Sada et al., 2015). Interestingly, hippocampal interneurons were found to be
32 insensitive to glucose deprivation in whole cell configuration (Sada et al., 2015) but
33 not in perforated patch configuration (Zawar and Neumcke, 2000) whereas almost
34 the opposite was found in CA1 pyramidal cells. Whether altered intracellular

1 metabolism by whole-cell recording accounted for the apparent lack of ATP
2 sensitivity remains to be determined.

3

4 **Lactate as an energy substrate for neurons and an enhancer of spiking activity** 5 **and neuronal plasticity**

6 We confirmed that the ATP produced by cortical neurons was mostly derived from
7 oxidative phosphorylation and marginally from glycolysis (Almeida et al., 2001;Hall et
8 al., 2012). Together with the enhancement of spiking activity through K_{ATP} channels
9 by lactate, but not by glucose, our data support both the notion that lactate is a
10 preferred energy substrate over glucose for cortical neurons (Bouzier-Sore et al.,
11 2003) and the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis (Pellerin and Magistretti,
12 1994). Although the local cellular origin of lactate has been recently questioned (Lee
13 et al., 2012;Diaz-Garcia et al., 2017), a growing number of evidence indicates that
14 astrocytes are major central lactate producers (Almeida et al., 2001;Choi et al.,
15 2012;Sotelo-Hitschfeld et al., 2015;Karagiannis et al., 2015;Le Douce J. et al.,
16 2020;Jimenez-Blasco et al., 2020).

17 Glutamatergic synaptic transmission stimulates blood glucose uptake, astrocyte
18 glycolysis, as well as lactate release (Pellerin and Magistretti, 1994;Voutsinos-Porche
19 et al., 2003;Ruminot et al., 2011;Choi et al., 2012;Sotelo-Hitschfeld et al.,
20 2015;Lerchundi et al., 2015) and diffusion through the astroglial gap junctional
21 network (Rouach et al., 2008). This indicates that local and fast glutamatergic
22 synaptic activity would be translated by astrocyte metabolism into a widespread and
23 long-lasting extracellular lactate increase (Prichard et al., 1991;Hu and Wilson,
24 1997a), which could in turn enhance the firing of both excitatory and inhibitory
25 neurons (Figure 7). Such a lactate surge would be spatially confined by the gap
26 junctional connectivity of the astroglial network, which in layer IV represents an
27 entire barrel (Houades et al., 2008).

28 This suggests that increased astrocytic lactate induced by whisker stimulation could
29 enhance the activity of the cortical network and fine-tune upcoming sensory
30 processing for several minutes, thereby favoring neuronal plasticity. Along this line,
31 lactate derived from astrocyte glycogen supports both neuronal activity and long-term
32 memory formation (Suzuki et al., 2011;Choi et al., 2012;Vezzoli et al., 2020).
33 Similarly, cannabinoids, which notably alter neuronal processing and memory

1 formation (Stella et al., 1997), hamper lactate production by astrocytes (Jimenez-
2 Blasco et al., 2020).
3 Peripheral lactate produced by skeletal muscles during intense physical exercise and
4 consumed by the active brain (Quistorff et al., 2008) could also have a similar but
5 more global effect on neuronal processing and plasticity. Blood-borne lactate has
6 been shown to promote learning and memory formation via brain-derived
7 neurotrophic factor (El Hayek L. et al., 2019). It is worth noting that the production of
8 this neurotrophin is altered in Kir6.2^{-/-} mice and impaired by a K_{ATP} channel opener
9 (Fan et al., 2016), both conditions compromising the effect of lactate on spiking
10 activity. Hence, the increase in astrocyte or systemic lactate could fine-tune neuronal
11 processing and plasticity in a context-dependent manner and their coincidence could
12 be potentially synergistic.

13

14 **Lactate-sensing compensatory mechanisms**

15 Since excitatory neuronal activity increases extracellular lactate (Prichard et al.,
16 1991;Hu and Wilson, 1997a) and lactate enhances neuronal activity, such a positive
17 feedback loop (Figure 7) suggests that compensatory mechanisms might be
18 recruited to prevent an overexcitation of neuronal activity by lactate supply. A
19 metabolic negative feedback mechanism could involve the impairment of astrocyte
20 metabolism and lactate release by endocannabinoids (Jimenez-Blasco et al., 2020)
21 produced during intense neuronal activity (Stella et al., 1997).

22 Another possibility would consist in a blood flow decrease that would in turn reduce
23 the delivery of blood glucose and subsequent local lactate production and release but
24 also blood-borne lactate. Some GABAergic interneuron subtypes (Cauli et al.,
25 2004;Uhlirva et al., 2016;Krawchuk et al., 2019), but also astrocytes (Girouard et al.,
26 2010), can trigger vasoconstriction and blood flow decrease when their activity is
27 increased. This could provide a negative hemodynamic feedback restricting spatially
28 and temporally the increase of spiking activity by lactate.

29 PV-expressing and SOM-expressing interneurons exhibit higher mitochondrial
30 content and apparent oxidative phosphorylation than pyramidal cells (Gulyas et al.,
31 2006) suggesting that interneurons would more rapidly metabolize and sense lactate
32 than pyramidal cells. These inhibitory GABAergic interneurons might therefore
33 silence the cortical network, thereby providing a negative neuronal feedback loop.
34 Active decrease in blood flow is associated with a decrease in neuronal activity

1 (Shmuel et al., 2002;Shmuel et al., 2006;Devor et al., 2007). Vasoconstrictive
2 GABAergic interneurons may underlie for both processes and could contribute to
3 returning the system to a low lactate state.
4

5 **Conclusion**

6 Our data indicate that lactate is both an energy substrate for cortical neurons and a
7 signaling molecule enhancing their spiking activity. This suggests that a coordinated
8 neurovascular and neurometabolic coupling would define a time window of an up
9 state of lactate that, besides providing energy and maintenance to the cortical
10 network, would fine-tune neuronal processing and favor, for example, memory
11 formation (Suzuki et al., 2011;Kann et al., 2014;Galow et al., 2014;Jimenez-Blasco et
12 al., 2020).
13

14 **Acknowledgments**

15 This work was supported by grants from the Human Frontier Science Program
16 (HFSP, RGY0070/2007, BC), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR 2011
17 MALZ 003 01, BC). AK was supported by a Fondation pour la Recherche Médicale
18 fellowship (FDT20100920106). We thank the animal facility of the IBPS (Paris,
19 France).
20

1 **Author contributions**

2 Conceptualization, T.G., J. Roeper and B.C.; Formal Analysis, J.N., B.C.;
3 Investigation, A.K., T.G., A.L., F.P., J.P., H.G., R.H., B.C., Resources, B.L., J.
4 Rossier, H.I., S.S., J. Roeper, B.C.; Writing –Original Draft, B.C.; Writing –Review &
5 Editing, T.G., J.N., B.L.G., R.E., D.L., B.L., J. Rossier, J.F.S., J. Roeper, B.C.,
6 Visualization, A.K., B.C.; Supervision, B.C.; Project Administration, B.C., Funding
7 Acquisition, B.C.

8

9 **Competing interests**

10 The authors declare no competing interests.

11

12 **Materials and methods**

13 **Key resources table**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Kynurenic acid	Sigma-Aldrich	K3375
Potassium D-gluconate	Sigma-Aldrich	G4500
Magnesium chloride solution	Sigma-Aldrich	M1028
EGTA	Sigma-Aldrich	E3889
HEPES	Sigma-Aldrich	H4034
Pinacidil monohydrate	Sigma-Aldrich	P154
Diazoxide	Sigma-Aldrich	D9035
Tolbutamide	Sigma-Aldrich	T0891
Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin	Millipore	475872
Gramicidin from <i>Bacillus aneurinolyticus</i> (<i>Bacillus brevis</i>)	Sigma-Aldrich	G5002
Sodium L-lactate	Sigma-Aldrich	L7022
α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid	Sigma-Aldrich	C2020
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	P2256
Sodium iodoacetate	Sigma-Aldrich	I2512
Potassium cyanide	Sigma-Aldrich	60178
Tetrodotoxin citrate	Latoxan Laboratory	L8502
Dithiothreitol	VWR	443852A
Primer "random"	Roche	11034731001
dNTPs	GE Healthcare Life Sciences	28-4065-52
Mineral Oil	Sigma-Aldrich	M5904
RNasin Ribonuclease Inhibitors	Promega	N2511
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen	18064014
Taq DNA Polymerase	Qiagen	201205
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
MEGAscript™ SP6 Transcription Kit	Ambion	AM1330
Experimental Models: Cell Lines		

Baby hamster kidney-21	ATCC	CCL-10
Experimental Models: Organisms/Strains		
Rat: Wistar	Janvier Labs	jHan:WI
Mouse: Wild type C57BL/6RJ	Janvier Labs	C57BL/6RJ
Mouse: Kir6.2 knockout (KO)	Miki et al., 1998	MGI:2178821
Oligonucleotides		
PCR primer rat vGluT1 external sense: 5'-GGCTCCTTTTTCTGGGGGTAC-3'	(Gallopín et al., 2006)	N/A
PCR primer rat/mouse vGluT1 external antisense: 5'-CCAGCCGACTCCGTTCTAAG-3'	(Gallopín et al., 2006)	N/A
PCR primer rat vGluT1 internal sense: 5'-TGGGGGTACATTGTCACTCAGA-3'	(Gallopín et al., 2006)	N/A
PCR primer rat vGluT1 internal antisense: 5'-ATGGCAAGCAGGGTATGTGAC-3'	(Gallopín et al., 2006)	N/A
PCR primer rat/mouse GAD65 external sense: 5'-CCAAAAGTTCACGGGCGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat/mouse GAD65 external antisense: 5'-TCCTCCAGATTTTGC GGTTG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD65 internal sense: 5'-TGAGAAGCCAGCAGAGAGCG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD65 internal antisense: 5'-TGGGGTAATGGAAATCAATCACTT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD67 external sense: 5'-ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD67 external antisense: 5'-GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD67 internal sense: 5'-CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat GAD67 internal antisense: 5'-GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NOS-1 external sense: 5'-CCTGGGGCTCAAATGGTATG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NOS-1 external antisense: 5'-CACAAATCCACCCAGTCGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NOS-1 internal sense: 5'-CCTCCCCGCTGTGTCCAA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NOS-1 internal antisense: 5'-GAGTGGTGGTCAACGATGGTCA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CB external sense: 5'-GAAAGAAGGCTGGATTGGAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CB external antisense: 5'-CCCACACATTTTGATTCCCTG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CB internal sense: 5'-ATGGGCAGAGAGATGATGGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CB internal antisense: 5'-TATCATCCACGGTCTTGTTC-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NOS-1 internal antisense: 5'-GAGTGGTGGTCAACGATGGTCA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat PV external sense: 5'-GCCTGAAGAAAAGAGTGCGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat PV external antisense: 5'-GTCCCCGTCCTTGCTCCAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat PV internal sense: 5'-GCGGATGATGTGAAGAAGGTG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat PV internal antisense: 5'-CAGCCATCAGCGTCTTTGTT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CR external sense: 5'-TTGATGCTGACGGAAATGGGTA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CR external antisense: 5'-CAAGCCTCCATAAACTCAGCG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CR internal sense: 5'-GCTGGAGAAGGCAAGGAAAGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CR internal antisense: 5'-ATTCTCTCGGTTGGCAGGA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NPY external sense: 5'-CGAATGGGGCTGTGTGGA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NPY external antisense: 5'-AGTTTCATTTCCCATCACCAT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A

PCR primer rat NPY internal sense: 5'-CCCTCGCTCTATCCCTGCTC-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat NPY internal antisense: 5'-GTTCTGGGGGCATTTTCTGTG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat VIP external sense: 5'-TTATGATGTGTCCAGAAATGCGAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat VIP external antisense: 5'-TTTTATTTGGTTTTGCTATGGAAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat VIP internal sense: 5'-TGGCAAACGAATCAGCAGTAGC-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat VIP internal antisense: 5'-GAATCTCCCTCACTGCTCCTCT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat SOM external sense: 5'-ATGCTGTCTGCGTCTCCA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat SOM external antisense: 5'-GCCTCATCTCGCTGCTCA-3'	(Férezou et al., 2007)	N/A
PCR primer rat SOM internal sense: 5'-GCATCGTCTGGCTTTGGG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat SOM internal antisense: 5'-AGGCTCCAGGGCATCGTTCT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CCK external sense: 5'-TGTCTGTGCGTGGTATGGC-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CCK external antisense: 5'-GCATAGCAACATTAGGTCTGGGAG-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CCK internal sense: 5'-ATACATCCAGCAGGTCCGCA-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat CCK internal antisense: 5'-GGTCGTGTGCGTGGTTGTTT-3'	(Karagiannis et al., 2009)	N/A
PCR primer rat Kir6.1 external sense: 5'-CTGGCTCACAAGAACATCCG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.1 external antisense: 5'-AGCGTCTCTGCCCTTCTGTG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.1 internal sense: 5'-GCTGGCTGCTCTTCGCTATC-3'	(Varin et al., 2015)	N/A
PCR primer rat Kir6.1 internal antisense: 5'-TTCTCCCTCCAAACCAATG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.2 external sense: 5'-CCCCACACGCTGCTCATT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.2 external antisense: 5'-AGGAGCCAGGTCGTAGAGCG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.2 internal sense: 5'-GCGTCACAAGCATCCACTCC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat Kir6.2 internal antisense: 5'-CCACCCACACCGTTCTCCAT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR1 external sense: 5'-GGTGAAGAAGCCTCCGATGA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR1 external antisense: 5'-GGTGAAGAAGCCTCCGATGA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR1 internal sense: 5'-GGTTCGGTCCACTGTCAAGG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR1 internal antisense: 5'-GTCAGCGTCTCCATCCGTGC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2 external sense: 5'-CGCTGCCTTTGAGTCTGT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2 external antisense: 5'-GATGGCAAGGAGGAGAGACG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2 internal sense: 5'-TGGACAACACTACGAGCAGGCG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2 internal antisense: 5'-CACAACCCACCTGACCCACA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SOM intron external sense: 5'-GGAAATGGCTGGGACTCGTC-3'	(Hill et al., 2007)	N/A
PCR primer rat SOM intron external antisense: 5'-AAACCATGGATGATAGGAAGTCGT-3'	(Hill et al., 2007)	N/A
PCR primer rat SOM intron internal sense: 5'-GTCCCCTTTGCGAATTCCT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SOM intron internal antisense: 5'-TTCGAGCAGCTCCATTTCC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2A/B sense: 5'-ACTTCAGCGTTGGACAGAGACA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat SUR2A/B antisense: 5'-GGTCAGCAGTCAGAATGGTGTG-3'	This paper	N/A

PCR primer mouse vGluT1 external sense: 5'-GGCTCCTTTTTCTGGGGCTAC-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse vGluT1 internal sense: 5'-ATTTCGAGCCAACAGGGTCT-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse vGluT1 internal antisense: 5'-TGGCAAGCAGGGTATGTGAC-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse GAD65 internal sense: 5'-CACCTGCGACCAAAAACCCCT-3'	(Perrenoud et al., 2012)	N/A
PCR primer mouse GAD65 internal antisense: 5'-GATTTTGC GGTTGGTCTGCC-3'	(Perrenoud et al., 2012)	N/A
PCR primer mouse GAD67 external sense: 5'-TACGGGGTTCGCACAGGTC-3'	(Férézou et al., 2002)	N/A
PCR primer mouse GAD67 external antisense: 5'-CCCAGGCAGCATCCACAT-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse GAD67 internal sense: 5'-CCCAGAAGTGAAGACAAAAGGC-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse GAD67 internal antisense: 5'-AATGCTCCGTAACAGTCGTGC-3'	(Cabezas et al., 2013)	N/A
PCR primer mouse ATP1α1 external sense: 5'-CAGGGCAGTGTTCAGGCTAA-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α1 external antisense: 5'-CCGTGGAGAAGGATGGAGC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α1 internal sense: 5'-TAAGCGGGCAGTAGCGGG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α1 internal antisense: 5'-AGGTGTTTGGGCTCAGATGC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α2 external sense: 5'-AGTGAGGAAGATGAGGGACAGG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α2 external antisense: 5'-ACAGAAGCCCAGCACTCGTT-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α2 internal sense: 5'-AAATCCCCTCAACTCCACCA-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α2 internal antisense: 5'-GTTCCCAAGTCCTCCAGC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α3 external sense: 5'-CGGAAATACAATACTGACTGCGTG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α3 external antisense: 5'-GTCATCCTCCGTCCTGCC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α3 internal sense: 5'-TGACACACAGTAAAGCCCAGGA-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse ATP1α3 internal antisense: 5'-CCACAGCAGGATAGAGAAGCCA-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse Kir6.2 external sense: 5'-CGGAGAGGGCACCAATGT-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse Kir6.2 external antisense: 5'-CACCCAGCCATTCTCCA-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse Kir6.2 internal sense: 5'-CATCCACTCCTTTTCATCTGCC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse Kir6.2 internal antisense: 5'-TCGGGGCTGGTGGTCTTG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse SUR1 external sense: 5'-CAGTGTGCCCCCGAGAG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse SUR1 external antisense: 5'-GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse SUR1 internal sense: 5'-ATCATCGGAGGCTTCTTACC-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse SUR1 internal antisense: 5'-GGTCTTCTCCCTCGCTGTCTG-3'	(Devienne et al., 2018)	N/A
PCR primer mouse SOM intron external sense: 5'-CTGTCCCCCTTACGAATCCC-3'	(Thoby-Brisson et al., 2003)	N/A
PCR primer mouse SOM intron external antisense: 5'-CCAGCACCAGGGATAGAGCC-3'	(Thoby-Brisson et al., 2003)	N/A
PCR primer mouse SOM intron internal sense: 5'-CTTACGAATCCCCAGCCTT-3'	(Cea-del Rio et al., 2010)	N/A
PCR primer mouse SOM intron internal antisense: 5'-TTGAAAGCCAGGGAGGAACT-3'	(Cea-del Rio et al., 2010)	N/A
PCR primer rat MCT1 external sense: 5'-GTCAGCCTTCCTCCTTTCCA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT1 external antisense: 5'-TCCGCTTTCTGTTCTTTGGC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT1 internal sense: 5'-TTGTTGCGAATGGAGTGTGC-3'	This paper	N/A

PCR primer rat MCT1 internal antisense: 5'-CACGCCACAAGCCCAGTATG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT2 external sense: 5'-GCGAAGTCTAAAAGTAAGGTTGGC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT2 external antisense: 5'-ATTTACCAGCCAGGGGAGGG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT2 internal sense: 5'-CCGTATGCTAAGGACAAAGGAGT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT2 internal antisense: 5'-GGGAAGAACTGGGCAACACT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT4 external sense: 5'-CATTGGTCTCGTGCTGT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT4 external antisense: 5'-CCCCGTTTTTCTCAGGCTCT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT4 internal sense: 5'-TGTGGCTGTGCTCATCGGAC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat MCT4 internal antisense: 5'-CCTCTTCTCTTCCCGATGC-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-A external sense: 5'-GAAGAACAGGTCCCCCAGAA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-A external antisense: 5'-GGGTTTGAGACGATGAGCAGT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-A internal sense: 5'-CAGTTGTTGGGTTGGTGCT-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-A internal antisense: 5'-TCTCTCCCTTTGCTGACGG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-B external sense: 5'-ACTGCCGTCCCGAACAACAA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-B external antisense: 5'-ACTCTCCCTCTCTGCTGG-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-B internal sense: 5'-TCTGGGAAGTCTCTGGCTGA-3'	This paper	N/A
PCR primer rat LDH-B internal antisense: 5'-TTGGCTGTCACGGAGTAATCTTT-3'	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pcDNA-Ateam1.03YEMK	(Imamura et al., 2009)	N/A
pSinRep5 plasmid	Invitrogen	K750-01
pDH(26S) helper plasmid	Invitrogen	K750-01
Software and Algorithms		
Pclamp 10.2	Molecular Devices	https://www.moleculardevices.com
Matlab 2018b	MathWorks	https://fr.mathworks.com/
Statistica 6.1	Statsoft	http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features
GraphPad Prism 7	GraphPad	https://www.graphpad.com/
ImagingWorkbench 6.0.25	INDEC Systems	http://www.indecbiosystems.com
FIJI	(Schindelin et al., 2012)	https://fiji.sc/Fiji
Image-Pro Analyzer 7.0	MediaCybernetics	http://www.mediacy.com/
Other		
VT1000S	Leica	N/A
BX51WI	Olympus	N/A
WI-DPMC	Olympus	N/A
LUMPlan FI /IR 60x/0.90 W	Olympus	N/A
LUMPlan FI /IR 40x/0.80 W	Olympus	N/A
CoolSnap HQ2	Roper Scientific	N/A
Axopatch 200B	Molecular Devices	N/A
Digidata 1440A	Molecular Devices	N/A
S900 stimulator	Dagan corporation	N/A
pE-2	CoolLED	N/A
FF395/495/610-Di01-25x36	Semrock	N/A
FF01-425/527/685-25	Semrock	N/A
780 nm Collimated LED	Thorlabs	M780L3-C1
Dotd Gradient Contrast	Luigs and Neumann	200-100 200 0155

725 DCSPXR	Semrock	N/A
XC ST-70 CE	Sony	N/A
Millicell	Millipore	PICMORG50
FF02-438/24-25	Semrock	N/A
FF458-Di02-25x36	Semrock	N/A
FF01-483/32-25	Semrock	N/A
FF01-542/27-25	Semrock	N/A
Lambda 10B	Sutter Instruments	N/A

1 **Lead contact and materials availability**

2 Further information and requests for resources and reagents should be directed to,
3 and will be fulfilled by, the lead contact, B. Cauli (bruno.cauli@upmc.fr).

4
5 **Experimental model and subject details**

6 Wistar rats, C57BL/6RJ or Kir6.2 KO mice were used for all experiments in
7 accordance with French regulations (Code Rural R214/87 to R214/130) and
8 conformed to the ethical guidelines of both the directive 2010/63/EU of the European
9 Parliament and of the Council and the French National Charter on the ethics of
10 animal experimentation. A maximum of 3 rats or 5 mice were housed per cage and
11 single animal housing was avoided. Male rats and mice of both genders were housed
12 on a 12-hour light/dark cycle in a temperature-controlled (21–25°C) room and were
13 given food and water *ad libitum*. Animals were used for experimentation at 13-24
14 days of age.

1 **Cortical slice preparation**

2 Rats or mice were deeply anesthetized with isoflurane. After decapitation brains were
3 quickly removed and placed into cold (~4°C) oxygenated artificial cerebrospinal fluid
4 (aCSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26
5 NaHCO₃, 10 glucose, 15 sucrose, and 1 kynurenic acid. Coronal slices (300 μm
6 thick) containing the barrel cortex were cut with a vibratome (VT1000S, Leica) and
7 allowed to recover at room temperature for at least 1h in aCSF saturated with O₂/CO₂
8 (95 %/5 %) as previously described (Karagiannis et al., 2009;Devienne et al., 2018).

9

10 **Whole-cell patch-clamp recording**

11 Patch pipettes (4-6 MΩ) pulled from borosilicate glass were filled with 8 μl of RNase
12 free internal solution containing in (mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA, 10
13 HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm). Whole-cell recordings were performed at 25.3 ±
14 0.2°C using a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Molecular Devices). Data were
15 filtered at 5-10 kHz and digitized at 50 kHz using an acquisition board (Digidata 1440,
16 Molecular Devices) attached to a personal computer running pCLAMP 10.2 software
17 package (Molecular Devices). For ATP washout experiments neurons were recorded
18 in voltage clamp mode using an ATP-free internal solution containing in (mM): 140
19 KCl, 20 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2.

20

21 **Cytoplasm harvesting and scRT-PCR**

22 At the end of the whole-cell recording, lasting less than 15 min, the cytoplasmic
23 content was aspirated in the recording pipette. The pipette's content was expelled
24 into a test tube and reverse transcription (RT) was performed in a final volume of 10
25 μl, as described previously (Lambolez et al., 1992). The scRT-PCR protocol was
26 designed to probe simultaneously the expression of neuronal markers, K_{ATP} channels
27 subunits or some key elements of energy metabolism. Two-steps amplification was
28 performed essentially as described (Cauli et al., 1997;Devienne et al., 2018). Briefly,
29 cDNAs present in the 10 μl reverse transcription reaction were first amplified
30 simultaneously using all external primer pairs listed in the Key Ressources Table.
31 Taq polymerase and 20 pmol of each primer were added to the buffer supplied by the
32 manufacturer (final volume, 100 μl), and 20 cycles (94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 35
33 s) of PCR were run. Second rounds of PCR were performed using 1 μl of the first
34 PCR product as a template. In this second round, each cDNA was amplified

1 individually using its specific nested primer pair (Key Ressources Table) by
2 performing 35 PCR cycles (as described above). 10 μ l of each individual PCR
3 product were run on a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide using Φ X174
4 digested by *Hae*III as a molecular weight marker.

5

6 **Perforated patch-clamp recording**

7 Gramicidin stock solution (2 mg/ml, Sigma-Aldrich) was prepared in DMSO and
8 diluted to 10-20 μ g/ml (Zawar and Neumcke, 2000) in the RNase free internal
9 solution described above. The pipette tip was filled with gramicidin-free solution.
10 Progress in perforation was evaluated by monitoring the capacitive transient currents
11 elicited by -10 mV voltage pulses from a holding potential of -60 mV. In perforated
12 patch configuration, a continuous current (52 ± 7 pA) was injected to induce the
13 spiking of action potentials at stable firing rates of 4.1 ± 0.4 Hz obtained after an
14 equilibration period of 3.6 ± 0.5 min. Membrane and access resistance were
15 continuously monitored by applying -50 pA hyperpolarizing current pulses lasting 1 s
16 every 10 s using an external stimulator (S900, Dagan) connected to the amplifier.
17 Recordings were stopped when going into whole-cell configuration occurred, as
18 evidenced by sudden increase of spike amplitude and decrease of access
19 resistance.

20

21 **NADH imaging**

22 Recordings were made in layer II-III of the rat somatosensory cortex. Wide-field
23 fluorescent images were obtained using a double port upright microscope BX51WI,
24 WI-DPMC, Olympus) with a 60x objective (LUMPlan FI /IR 60x/0.90 W, Olympus)
25 and a digital camera (CoolSnap HQ2, Roper Scientific) attached on the front port of
26 the microscope. NADH autofluorescence was obtained by 365 nm excitation with a
27 Light Emitting Device (LED, pE-2, CoolLED) using Imaging Workbench 6.0.25
28 software (INDEC Systems) and dichroic (FF395/495/610-Di01-25x36, Semrock) and
29 emission filters (FF01-425/527/685-25, Semrock). Infrared Dodt gradient contrast
30 images (IR-DGC, (Dodt and Zieglgansberger, 1998)) were obtained using a 780 nm
31 collimated LED (M780L3-C1,Thorlabs) as a transmitted light source and DGC optics
32 (Luigs and Neumann). Autofluorescence and IR-DGC images were collected every
33 10s by alternating the fluorescence and transmitted light sources. In parallel, infrared
34 transmitted light images of slices were also continuously monitored on the back-port

1 of the microscope using a customized beam splitter (725 DCSPXR, Semrock) and an
2 analogic CCD camera (XC ST-70 CE, Sony). The focal plane was maintained
3 constant on-line using infrared DGC images of cells as anatomical landmarks
4 (Lacroix et al., 2015).

5

6 **Subcloning and viral production**

7 The coding sequence of the ATP sensor ATeam1.03YEMK (Imamura et al., 2009)
8 was subcloned into the viral vector pSinRep5. Sindbis virus was produced as
9 previously described (Piquet et al., 2018). Recombinant pSinRep5 and helper
10 plasmid pDH26S (Invitrogen) were transcribed in vitro into capped RNA using the
11 Megascript SP6 kit (Ambion). Baby hamster kidney-21 cells (ATCC) were
12 electroporated with sensor-containing RNA and helper RNA ($2 \cdot 10^7$ cells, 950 μ F, 230
13 V) and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle Medium
14 supplemented with 5% fetal calf serum before collecting cell supernatant containing
15 the viruses. The virus titer (10^8 infectious particles/ml) was determined after counting
16 fluorescent baby hamster kidney cells infected using serial dilution of the stock virus.

17

18 **Brain slice viral transduction**

19 Brain slices were placed onto a millicell membrane (Millipore) with culture medium
20 (50% minimum essential medium, 50% Hank's balanced salt sodium, 6.5 g/l glucose
21 and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich) as previously described (Piquet
22 et al., 2018). Infection was performed by adding $\sim 5 \times 10^5$ particles per slice. Slices
23 were incubated overnight at 35°C in 5% CO₂. The next morning, brain slices were
24 equilibrated for 1h in aCSF containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2
25 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 15 sucrose. Slices were then placed into
26 the recording chamber, heated at ~ 30 °C and continuously perfused at 1-2 ml/min.

27

28 **FRET imaging**

29 Recordings were made from visually identified pyramidal cells in layer II-III of the rat
30 somatosensory cortex. Wide-field fluorescent images were obtained using a 40x
31 objective and a digital camera attached on the front port of the microscope. The ATP
32 sensor ATeam1.03YEMK was excited at 400 nm with a LED using Imaging
33 Workbench 6.0.25 software and excitation (FF02-438/24-25, Semrock) and dichroic
34 filters (FF458-Di02-25x36, Semrock). Double fluorescence images were collected

1 every 15s by alternating the fluorescence emission filters for the CFP (FF01-483/32-
2 25, Semrock) and the YFP (FF01-542/27-25, Semrock) using a filter wheel (Lambda
3 10B, Sutter Instruments). The focal plane was maintained constant on-line as
4 described above.

5

6 **Pharmacological studies**

7 Pinacidil (100 μ M, Sigma-Aldrich); Diazoxide (300 μ M, Sigma-Aldrich) and
8 Tolbutamide (500 μ M, Sigma-Aldrich), Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin
9 (MnTMPyP, 25 μ M, Millipore), α -cyano-4-hydroxycinnamate (4-CIN, 250 μ M, Sigma-
10 Aldrich); iodoacetic acid (IAA, 200 μ M, Sigma-Aldrich) or KCN (1 mM, Sigma-Aldrich)
11 was dissolved in aCSF from stock solutions of pinacidil (100 mM; NaOH 1M),
12 diazoxide (300 mM; NaOH 1M), tolbutamide (500 mM; NaOH 1M), 4-CIN (250 mM;
13 DMSO), IAA (200 mM, water) and KCN (1 M, water). Changes in extracellular
14 glucose, lactate or pyruvate concentration were compensated by changes in sucrose
15 concentration to maintain the osmolarity of the aCSF constant as previously
16 described (Miki et al., 2001;Varin et al., 2015;Piquet et al., 2018) and pH was
17 adjusted to 7.4.

18

19 **Quantification and statistical analysis**

20 **Analysis of somatic features**

21 The laminar location determined by infrared videomicroscopy and recorded as 1-4
22 according to a location right within layers I, II/III or IV. For neurons located at the
23 border of layers I-II/III and II/III-IV, the laminar location was represented by 1.5 and
24 3.5, respectively. Somatic features were measured from IR DGC of the recorded
25 neurons. Briefly, the soma was manually delineated using Image-Pro Analyzer 7.0
26 software (MediaCybernetics) and length of major and minor axes, perimeter and area
27 were extracted. The soma elongation was calculated as the ratio between major and

28 minor axis. Roundness was calculated according to: $\frac{perimeter^2}{4\pi \times area}$; a value close to 1 is
29 indicative of round somata.

30

1 **Analysis of electrophysiological properties**

2 32 electrophysiological properties chosen to describe the electrophysiological
3 diversity of cortical neurons (Ascoli et al., 2008) were determined using the I-clamp
4 fast mode of the amplifier as previously described (Karagiannis et al., 2009).
5 Membrane potential values were corrected for theoretical liquid junction potential (-
6 15.6 mV). Resting membrane potential was measured just after passing in whole-cell
7 configuration, and only cells with a resting membrane potential more negative than -
8 55 mV were analyzed further. Membrane resistance (R_m) and membrane time
9 constant (τ_m) were determined on responses to hyperpolarizing current pulses
10 (duration, 800 ms) eliciting voltage shifts of 10-15 mV negative to rest (Kawaguchi,
11 1993;Kawaguchi, 1995). Time constant was determined by fitting this voltage
12 response to a single exponential. Membrane capacitance (C_m) was calculated
13 according to $C_m = \tau_m / R_m$. Sag index was quantified as a relative decrease in
14 membrane conductance according to $(G_{sag} - G_{hyp}) / G_{sag}$ (Halabisky et al., 2006) where
15 G_{hyp} and G_{sag} correspond to the whole-cell conductance when the sag was inactive
16 and active, respectively. G_{sag} was measured as the slope of the linear portion of a
17 current–voltage (I–V) plot, where V was determined at the end of 800 ms
18 hyperpolarizing current pulses (-100 to 0 pA) and G_{hyp} as the slope of the linear
19 portion of an I–V plot, where V was determined as the maximal negative potential
20 during the 800 ms hyperpolarizing pulses. Rheobase was quantified as the minimal
21 depolarizing current pulse intensity (800 ms duration pulses, 10 pA increments)
22 generating at least one action potential. First spike latency (Gupta et al., 2000;Ascoli
23 et al., 2008) was measured at rheobase as the time needed to elicit the first action
24 potential. To describe different firing behaviors near threshold, spike frequency was
25 measured near spike threshold on the first trace in which at least three spikes were
26 triggered. Instantaneous discharge frequencies were measured and fitted to a
27 straight line according to $F_{threshold} = m_{threshold} \cdot t + F_{min.}$, where $m_{threshold}$ is the slope
28 termed adaptation, t the time and $F_{min.}$, the minimal steady state frequency. Analysis
29 of the action potentials waveforms was done on the first two spikes. Their amplitude
30 (A1 and A2) was measured from threshold to the positive peak of the spike. Their
31 duration (D1 and D2) was measured at half amplitude (Kawaguchi, 1993;Cauli et al.,
32 1997). Their amplitude reduction and the duration increase were calculated
33 according to $(A1 - A2) / A1$ and $(D2 - D1) / D1$, respectively (Cauli et al., 1997;Cauli et al.,
34 2000). The amplitude and the latency of the fast and medium afterhyperpolarization

1 (fAH and mAH) were measured for the first two action potentials as the difference
2 between spike threshold and the negative peak of the AHs (Kawaguchi, 1993). The
3 amplitude and latency of afterdepolarization (AD) following single spikes (Haj-
4 Dahmane and Andrade, 1997) were measured as the difference between the
5 negative peak of the fAH and the peak of the AD and between the spike threshold
6 and the peak of the AD, respectively. When neurons did not exhibit mAH or AD,
7 amplitude and latency were arbitrarily set to 0. A complex spike amplitude
8 accommodation during a train of action potentials, consisting in a transient decrease
9 of spikes amplitude, was measured as the difference between the peak of the
10 smallest action potential and the peak of the following largest action potential (Cauli
11 et al., 2000). Maximal firing rate was defined as the last trace before prominent
12 reduction of action potentials amplitude indicative of a saturated discharge. To take
13 into account the biphasic spike frequency adaptation (early and late) occurring at
14 high firing rates (Cauli et al., 1997;Cauli et al., 2000;Gallopín et al., 2006),
15 instantaneous firing frequency was fitted to a single exponential (Halabisky et al.,
16 2006) with a sloping baseline, according to : $F_{Saturation} = A_{sat} \cdot e^{-t/\tau_{sat}} + t \cdot m_{sat} + F_{max}$, where
17 A_{sat} corresponds to the amplitude of early frequency adaptation, τ_{sat} to the time
18 constant of early adaptation, m_{sat} to the slope of late adaptation and F_{max} to the
19 maximal steady state frequency.

20

21 **Unsupervised clustering**

22 To classify neurons unsupervised clustering was performed using the laminar
23 location of the soma, 10 molecular parameters (vGluT1, GAD65 and/or GAD67,
24 NOS-1, CB, PV, CR, NPY, VIP, SOM and CCK) and the 32 electrophysiological
25 parameters described above. Neurons positive for GAD65 and/or GAD67 were
26 denoted as GAD positive and these mRNAs were considered as a single molecular
27 variable as previously described (Gallopín et al., 2006). Parameters were
28 standardized by centering and reducing all of the values. Cluster analysis was run on
29 Statistica 6.1 software (Statsoft) using Ward's method (Ward, 1963). The final
30 number of clusters was established by hierarchically subdividing the clustering tree
31 into higher order clusters as previously described (Karagiannis et al., 2009).

32

1 **Analysis of voltage clamp recordings**

2 Whole-cell currents were measured from a holding potential of -70 mV and
3 membrane resistances were determined by applying a voltage step to -60 mV of 100
4 ms every 5 s. The effects of K_{ATP} channel modulators were measured at the end of
5 drug application by averaging, over a period of 1 minute, whole cell currents and
6 changes in membrane resistance relative to control baseline prior to the application
7 of drugs. Whole-cell K_{ATP} current and conductance were determined by subtracting
8 current and conductance measured under K_{ATP} channel activator by their value
9 measured under K_{ATP} channel blocker. The relative whole-cell K_{ATP} conductance was
10 determined by dividing the whole-cell K_{ATP} conductance by the whole cell
11 conductance measured under K_{ATP} channel activator. Whole-cell K_{ATP} current density
12 was determined by dividing the whole-cell K_{ATP} current by the membrane
13 capacitance. K_{ATP} current reversal potential was measured by subtracting I/V
14 relationships obtained during voltage ramps from -60 to -130 mV determined under
15 K_{ATP} channel activator and blocker, respectively.

16 During ATP washout experiments, whole-cell currents and I/V relationships were
17 measured every 10 s at a holding potential of -50 mV and during voltage ramps from
18 -40 to -120 mV, respectively. Washout currents were determined by subtracting the
19 whole-cell currents measured at the beginning and the end of the whole cell-
20 recording, respectively.

21

22 **Analysis of current clamp recordings**

23 Every 10 s, membrane potential and mean firing rate were measured and membrane
24 resistances were determined from voltage responses induced by -50 pA currents
25 pulses lasting 1 s. K_{ATP} voltage response and changes in membrane resistance and
26 firing rate were determined by subtracting their value measured under K_{ATP} channel
27 activator by their value measured under K_{ATP} channel blocker. Neurons were
28 considered as responsive to K_{ATP} channel modulators if the K_{ATP} channel activator
29 induced both a hyperpolarization and a decrease in membrane resistance reversed
30 by the K_{ATP} channel blocker.

31

32 **Analysis of perforated patch recordings**

33 Mean firing frequency was measured every 10 s. Quantification of spiking activity
34 was determined by averaging firing frequency over a period of 5 min preceding a

1 change in extracellular aCSF composition. Firing frequencies were normalized by the
2 averaged mean firing frequency measured under control condition.

3

4 **NADH imaging**

5 Shading correction was applied off-line on the NADH autofluorescence images using
6 the "Shading Corrector" plugin of FIJI software (Schindelin et al., 2012) and a blank
7 field reference image. To compensate for potential x-y drifts all IR-DGC images were
8 realigned off-line using the "StackReg" and "TurboReg" plugins (Thevenaz et al.,
9 1998) of FIJI software and the same registration was applied to the corrected
10 NAD(P)H autofluorescence images. To determine somatic regions of interest (ROIs)
11 the soma was manually delineated on IR-DGC images. The mean NADH
12 autofluorescence was measured at each time point using the same ROIs. Variations
13 of fluorescence intensity were expressed as the ratio $(F-F_0)/F_0$ where F corresponds
14 to the mean fluorescence intensity in the ROI at a given time point, and F₀
15 corresponds to the mean fluorescence intensity in the same ROI during the 5 min
16 control baseline prior to changes in aCSF composition. Effect of monocarboxylate
17 superfusion or oxidative phosphorylation blockade was quantified by averaging the
18 normalized ratio (R/R_0) during the last five minutes of drug application.

19

20 **FRET imaging**

21 All images were realigned off-line as described above using the YFP images as the
22 reference for registration. Fluorescence ratios were calculated by dividing the
23 registered YFP images by the registered CFP images using FIJI. The somatic ROIs
24 were manually delineated on the YFP images as described above. The mean ratio
25 was measured at each time point using the same ROIs. Variations of fluorescence
26 ratio were expressed as the ratio $(R-R_0)/R_0$ where R corresponds to the
27 fluorescence ratio in the ROI at a given time point, and R₀ corresponds to the mean
28 fluorescence ratio in the same ROI during the 10 min control baseline prior to drug
29 application. Effect of glycolysis or oxidative phosphorylation blockade was quantified
30 by averaging the normalized ratio during the last five minutes of drug application.

31

1 **Statistical analysis**

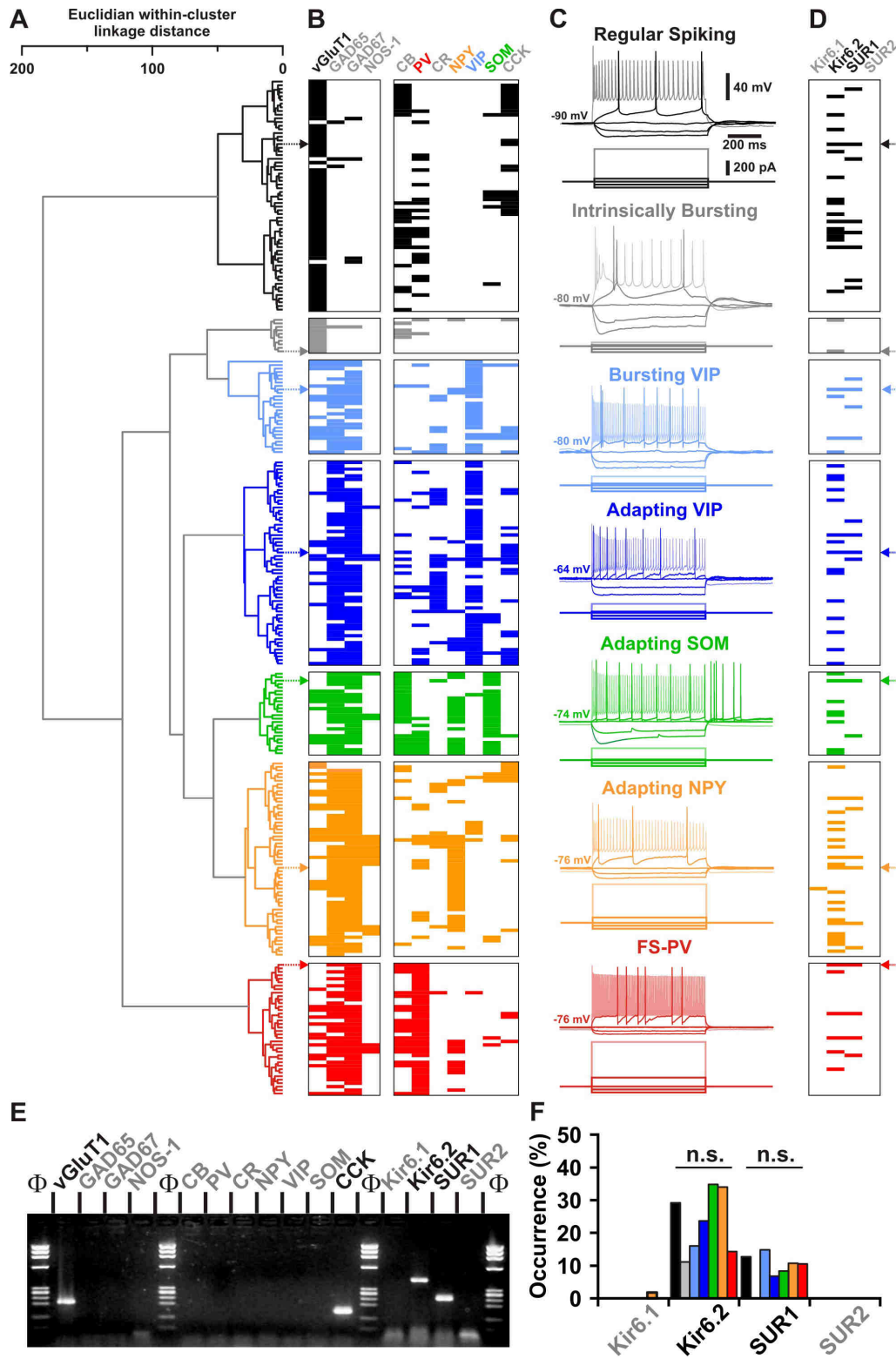
2 Statistical analyses were performed with Statistica 6.1 and GraphPad Prism 7. All
3 values are expressed as means \pm s.e.m. Normality of distributions and equality of
4 variances were assessed using the Shapiro–Wilk test and the Fisher F-test,
5 respectively. Parametric tests were only used if these criteria were met. Holm-
6 Bonferroni correction was used for multiple comparisons and p-values are given as
7 uncorrected. Statistical significance on all figures uses the following convention of
8 corrected p-values: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

9 Statistical significance of morphological and electrophysiological properties of
10 neurons was determined using the Mann-Whitney U test. Comparison of the
11 occurrence of expressed genes and of responsiveness of K_{ATP} channel modulators
12 between different cell types was determined using Fisher's exact test. Statistical
13 significance of the effects of K_{ATP} channel modulators was determined using the
14 Friedman and post hoc Dunn's tests. Significance of the effect of the ROS scavenger
15 was determined using one-tailed unpaired student t-test. Comparison of K_{ATP} channel
16 properties was determined using Mann-Whitney U, Student-t, or Kruskal-Wallis H
17 tests. Comparison of responses between Kir6.2^{+/-} and Kir6.2^{-/-} neurons was
18 determined using Mann-Whitney U test. Statistical significance of the effects of
19 energy substrates and drug applications on evoked firing in perforated patch
20 recordings was determined using Friedman and Dunn's tests. Comparison of the
21 effects of monocarboxylates and cyanide on NADH fluorescence was determined
22 using Mann-Whitney U test. Statistical significance of the effects of metabolic
23 inhibitors on intracellular ATP was determined using Friedman and Dunn's tests.

1 **Figure legends**

2 **Figure 1. Cortical neuron subtypes express Kir6.2 and SUR1 K_{ATP} channel subunits.**

3 **subunits.**



4
5

1 (A) Ward's clustering of 277 cortical neurons (left panel). The x axis represents the
2 average within-cluster linkage distance, and the y axis the individuals.

3 (B) Heatmap of gene expression across the different cell clusters. For each cell,
4 colored and white rectangles indicate presence and absence of genes, respectively.

5 (C) Representative voltage responses induced by injection of current pulses (bottom
6 traces) corresponding to -100, -50 and 0 pA, rheobase and intensity inducing a
7 saturating firing frequency (shaded traces) of a Regular Spiking neuron (black), an
8 Intrinsically Bursting neuron (gray), a Bursting VIP interneuron (light blue), an
9 Adapting VIP interneuron (blue), an Adapting SOM interneuron (green), an Adapting
10 NPY interneuron (orange), and a Fast Spiking-Parvalbumin interneuron (FS-PV, red).
11 The colored arrows indicate the expression profiles of neurons whose firing pattern is
12 illustrated in (C).

13 (D) Heatmap of the expression of the subunits of the K_{ATP} channels in the different
14 clusters.

15 (E) scRT-PCR analysis of the RS neuron depicted in (A-D).

16 (F) Histograms summarizing the expression profile of K_{ATP} channel subunits in
17 identified neuronal types. n.s. not statistically significant.

18

1 (A) Representative voltage responses of a FS-PV interneuron induced by injection of
2 current pulses (bottom traces).

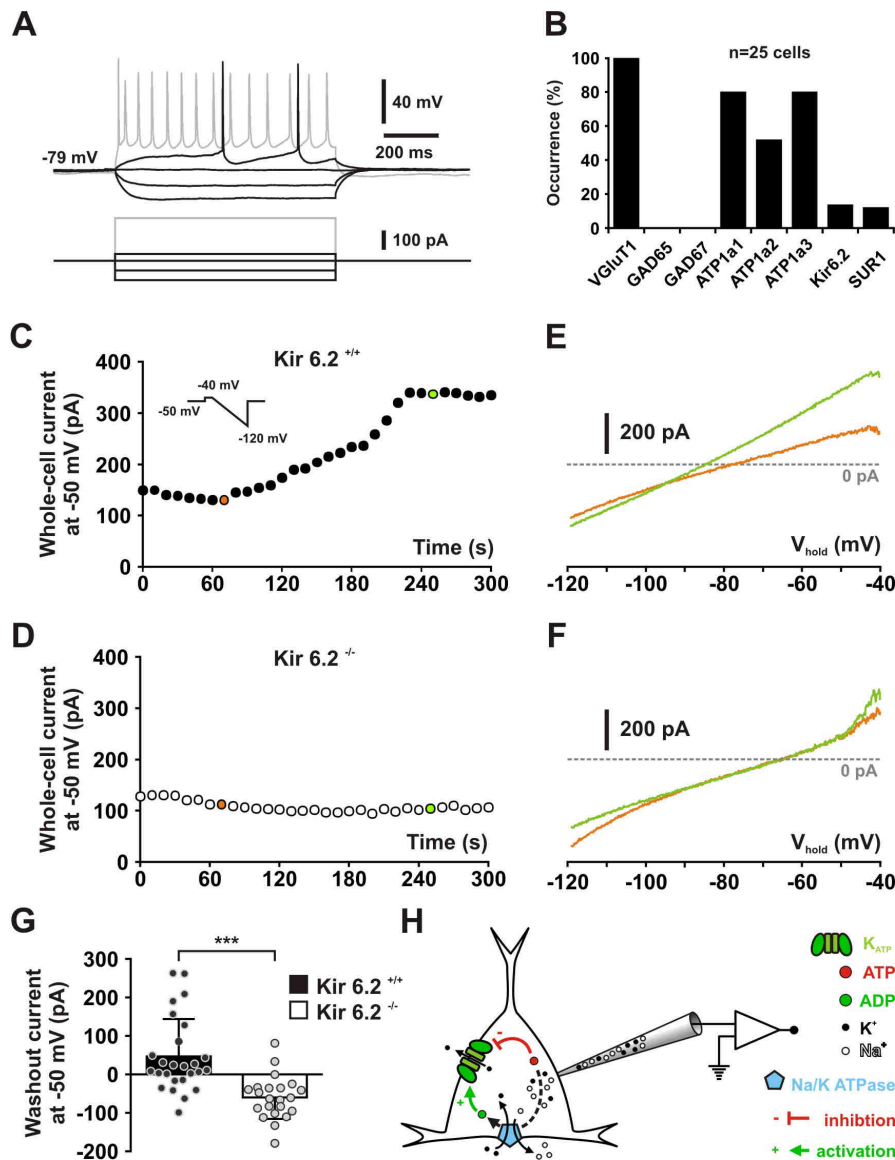
3 (B) Protocol of voltage pulses from -70 to -60 mV (left trace). Responses of whole-
4 cell currents in the FS-PV interneurons shown in (A) in control condition (black) and
5 in presence of pinacidil (blue), piazoxide (green) and tolbutamide (red) at the time
6 indicated by a-d in (C).

7 (C) Stationary currents recorded at -60 mV (filled circles) and membrane resistance
8 (open circles) changes induced by K_{ATP} channel modulators. The colored bars and
9 shaded zones indicate the duration of application of K_{ATP} channel modulators. Upper
10 and lower insets: changes in whole-cell currents and relative changes in membrane
11 resistance induced by K_{ATP} channel modulators, respectively.

12 (D) Whole cell current-voltage relationships measured under diazoxide (green trace)
13 and tolbutamide (red trace). K_{ATP} I/V curve (black trace) obtained by subtracting the
14 curve under diazoxide by the curve under tolbutamide. The arrow indicates the
15 reversal potential of K_{ATP} currents.

16 (E-H) Histograms summarizing the K_{ATP} current reversal potential (E,F) and relative
17 K_{ATP} conductance (G,H) in identified neuronal subtypes (E,G) or between
18 glutamatergic and GABAergic neurons (F,G). Data are expressed as mean \pm s.e.m.,
19 and the individual data points are depicted. n.s. not statistically significant.

1 **Figure 3. Kir6.2 is the pore forming subunit of K_{ATP} channels in cortical**
 2 **neurons.**



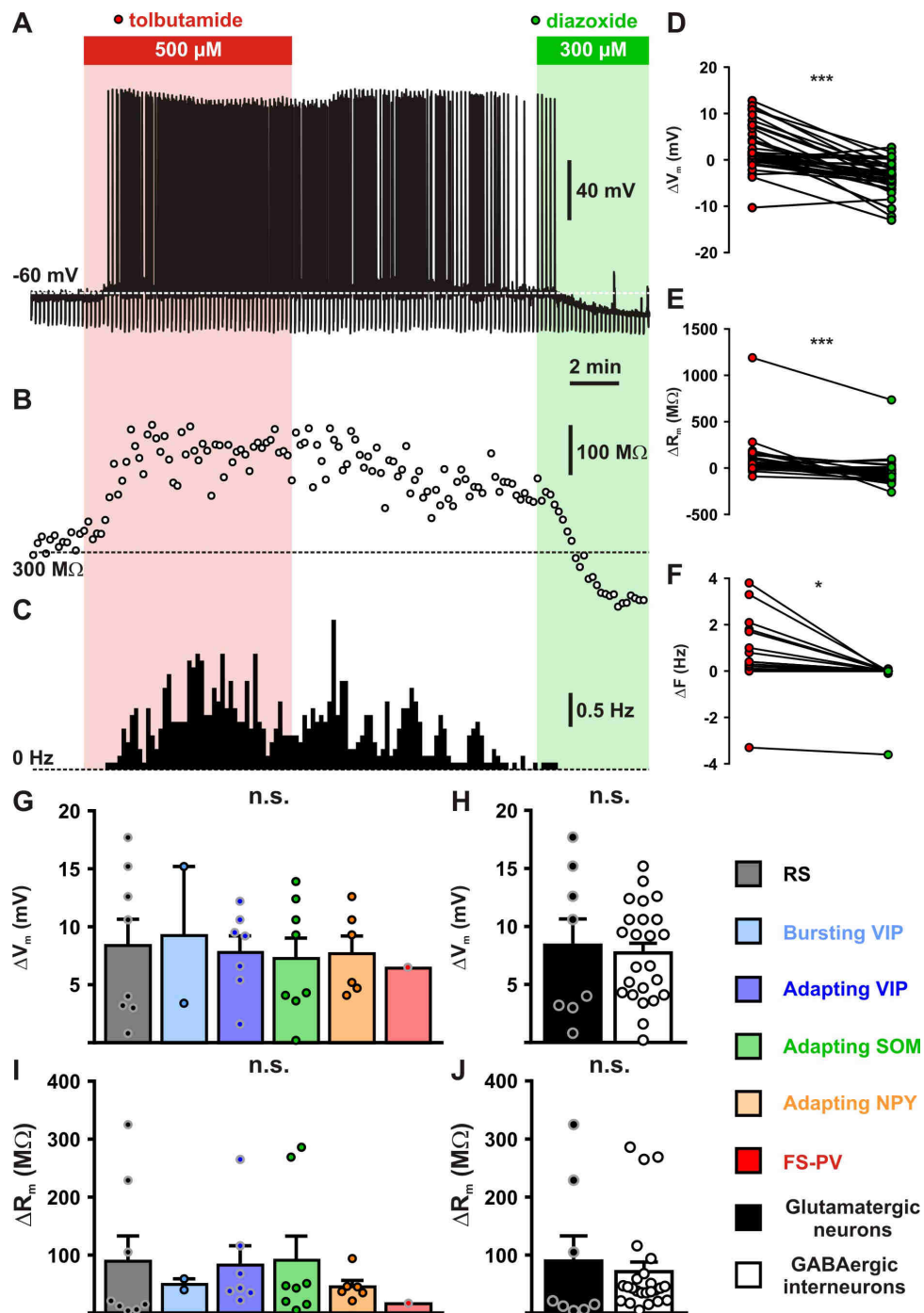
3
 4
 5 (A) Representative voltage responses of a mouse layer II/III RS pyramidal cell
 6 induced by injection of current pulses (bottom traces).

7 (B) Histograms summarizing the expression profile of vGluT1, GAD65 and 67, the
 8 ATP1a1-3 subunits of the Na/K ATPase and the Kir6.2 and SUR1 K_{ATP} channel
 9 subunits in layer II/III RS pyramidal cells from Kir6.2^{+/+} mice.

10 (C, D) Whole-cell stationary currents recorded at -50 mV during dialysis with ATP-
 11 free pipette solution in RS neurons of Kir6.2^{+/+} (C) and Kir6.2^{-/-} (D) mice. Inset;
 12 voltage clamp protocol.

- 1 (E, F) Current-voltage relationships obtained during ATP washout at the time
- 2 indicated by green and orange circles in (C, D) in RS neurons of Kir6.2^{+/+} (E) and
- 3 Kir6.2^{-/-} (F) mice.
- 4 (G) Histograms summarizing the whole-cell ATP washout currents in Kir6.2^{+/+} (black)
- 5 and Kir6.2^{-/-} (white) RS neurons. Data are expressed as mean \pm s.e.m., and the
- 6 individual data points are depicted.
- 7 (H) Diagram depicting the principle of the ATP washout experiment.
- 8

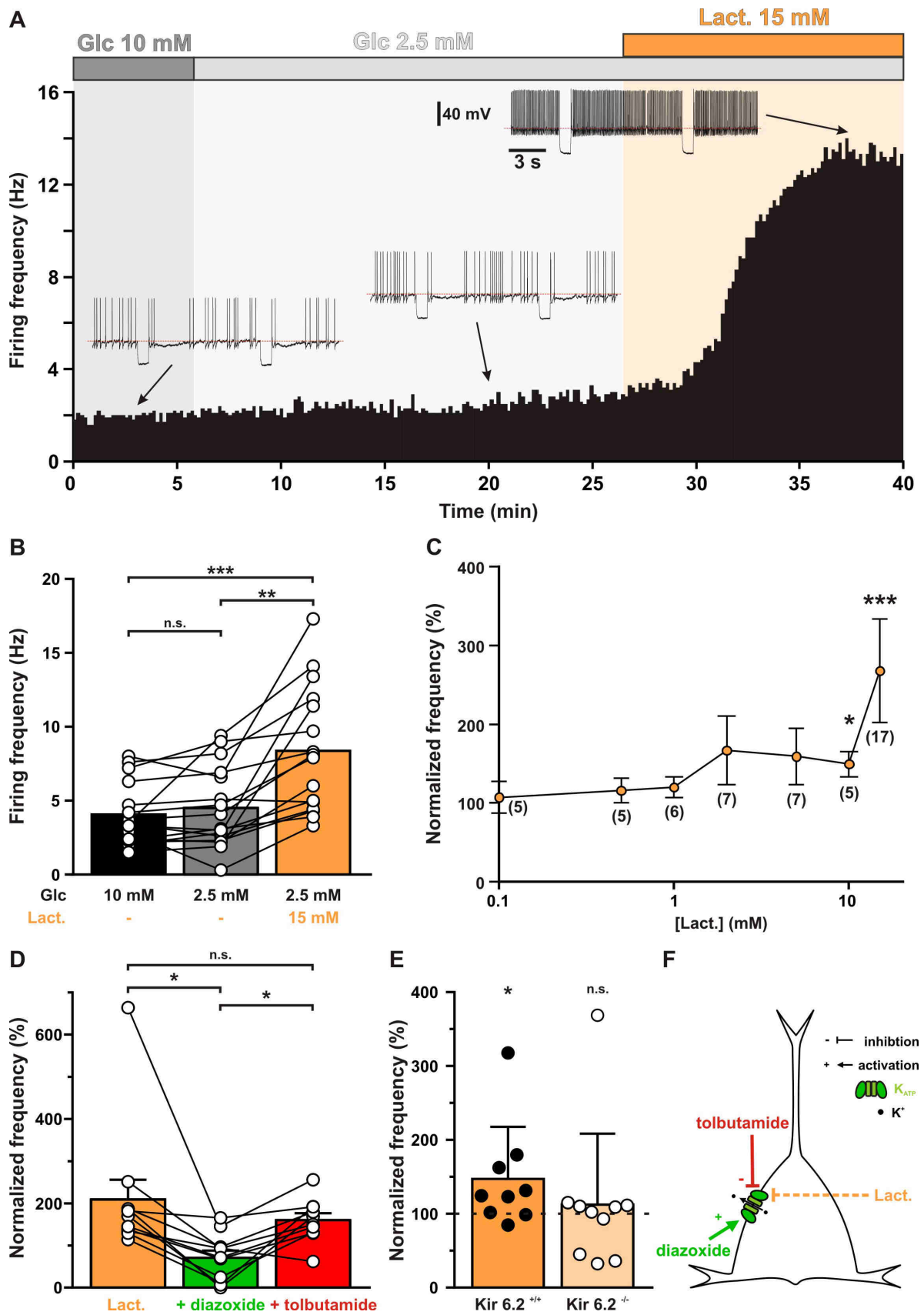
1 **Figure 4. Modulation of cortical neuronal excitability and activity by K_{ATP}**
 2 **channels.**



3
 4
 5 (A-C) Representative example showing the changes in membrane potential (A),
 6 resistance (B, open circles) and spiking activity (C) induced by application of
 7 tolbutamide (red) and diazoxide (green). The colored bars and shaded zones indicate
 8 the application duration of K_{ATP} channel modulators.

1 (D-F) Relative changes in membrane potential (D), resistance (E) and firing rate (F)
2 induced by tolbutamide and diazoxide in cortical neurons.
3 (G-J) Histograms summarizing the modulation of membrane potential (G, $H_{(5,32)}=$
4 0.15856 , $p=0.999$, and H, $U_{(8,24)}=96$, $p=1.0000$) and resistance (I, $H_{(5,32)}= 2.7566$,
5 $p=0.737$, and J, $U_{(8,24)}=73$, $p=0.3345$) by K_{ATP} channels in neuronal subtypes (G, I)
6 and groups (H, J). Data are expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data
7 points are depicted. n.s. not statistically significant.
8

1 **Figure 5. Lactate enhances cortical neuronal activity via K_{ATP} channel**
 2 **modulation.**



3
4

1 (A) Representative perforated patch recording of an adapting VIP neuron showing
2 the modulation of firing frequency induced by changes in the extracellular
3 concentrations of metabolites. The colored bars and shaded zones indicate the
4 concentration in glucose (grey) and lactate (orange). Voltage responses recorded at
5 the time indicated by arrows. The red dashed lines indicate -40 mV.

6 (B) Histograms summarizing the mean firing frequency during changes in
7 extracellular concentration of glucose (black and grey) and lactate (orange). Data are
8 expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted. n.s. not
9 statistically significant.

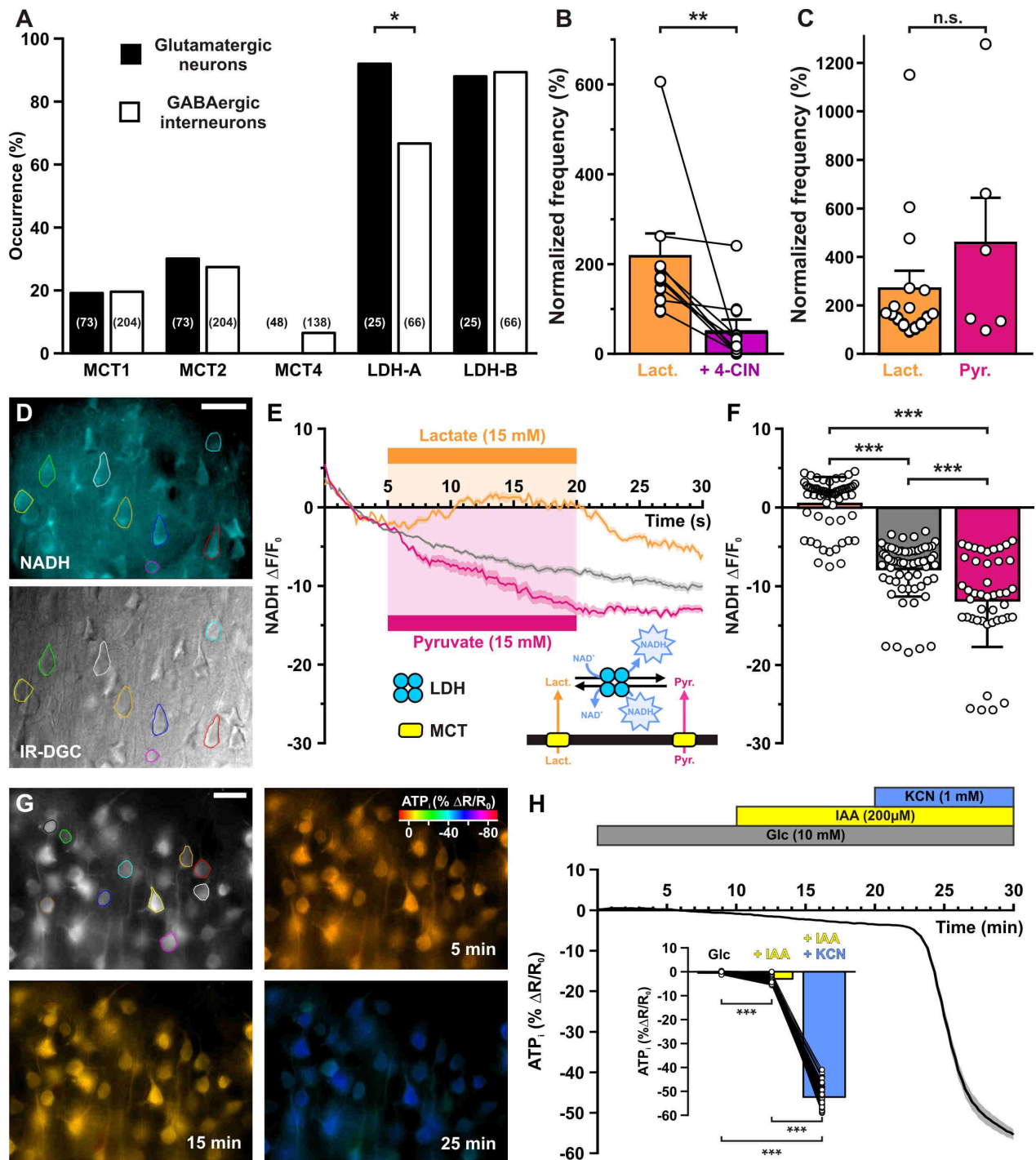
10 (C) Dose-dependent enhancement of firing frequency by lactate. Data are normalized
11 by the mean firing frequency in absence of lactate and are expressed as mean \pm
12 s.e.m. Numbers in brackets indicate the number of recorded neurons at different
13 lactate concentrations.

14 (D) Histograms summarizing the normalized frequency under 15 mM lactate (orange)
15 and its modulation by addition of diazoxide (green) or tolbutamide (red). Data are
16 expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted. n.s. not
17 statistically significant.

18 (E) Histograms summarizing the enhancement of normalized frequency by 15 mM
19 lactate in Kir6.2^{+/+} (orange) and Kir6.2^{-/-} (pale orange) mouse cortical neurons. The
20 dash line indicates the normalized mean firing frequency in absence of lactate. Data
21 are expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted.

22 (F) Diagram depicting the enhancement of neuronal activity by lactate via modulation
23 of K_{ATP} channels.

1 **Figure 6. Lactate enhancement of cortical neuronal activity involves lactate**
 2 **uptake and metabolism.**



3
 4
 5 (A) Histograms summarizing the expression profile of the monocarboxylate
 6 transporters MCT1, 2 and 4 and LDH A and B lactate dehydrogenase subunits in
 7 glutamatergic neurons (black) and GABAergic interneurons (white). The numbers in
 8 brackets indicate the number of analyzed cells.

1 (B) Histograms summarizing the enhancement of normalized frequency by 15 mM
2 lactate (orange) and its suppression by the MCTs inhibitor 4-CIN (purple). Data are
3 expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted.

4 (C) Histograms summarizing the enhancement of normalized frequency by 15 mM
5 lactate (orange) and pyruvate (magenta). Data are expressed as mean \pm s.e.m., and
6 the individual data points are depicted n.s. not statistically significant.

7 (D) Widefield NADH autofluorescence (upper panel, scale bar: 20 μ m) and
8 corresponding field of view observed under IR-DGC (lower panel). The somatic
9 regions of interest are delineated.

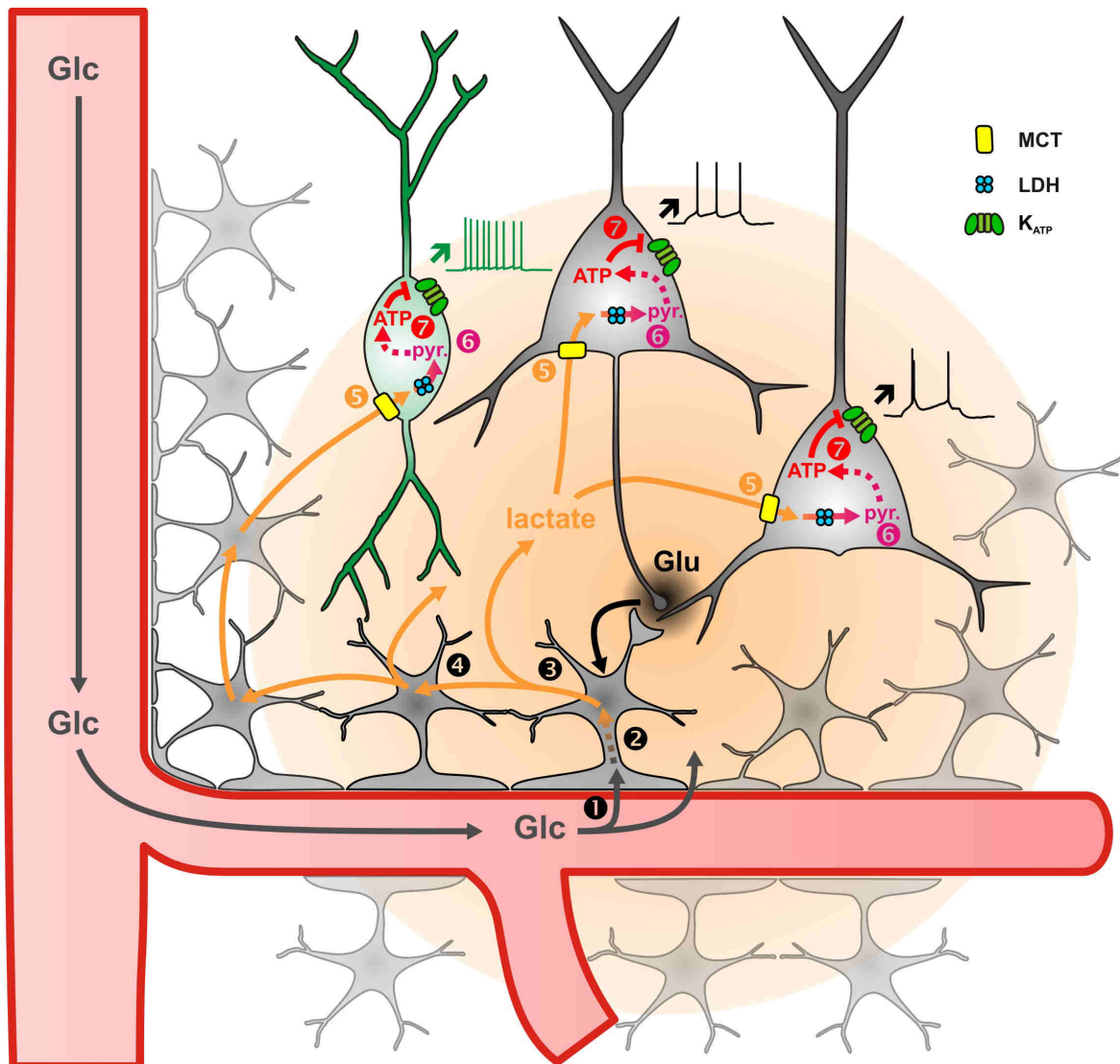
10 (E) Mean relative changes in NADH autofluorescence in control condition (grey) and
11 in response to 15 mM lactate (orange) or pyruvate (magenta). The colored bars
12 indicate the duration of applications. Data are expressed as mean \pm s.e.m. Inset:
13 diagram depicting the NADH changes induced by lactate and pyruvate uptake by
14 MCT and their interconversion by LDH.

15 (F) Histograms summarizing the mean relative changes in NAD(P)H
16 autofluorescence measured during the last 5 minutes of 15 mM lactate (orange) or
17 pyruvate (magenta) application and corresponding time in control condition (grey).
18 Data are expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted.

19 (G) Widefield YFP fluorescence of the ATP biosensor AT1.03^{YEMK} (upper left panel,
20 scale bar: 30 μ m) and pseudocolor images showing the intracellular ATP (YFP/CFP
21 ratio value coded by pixel hue, see scale bar in upper right panel) and the
22 fluorescence intensity (coded by pixel intensity) at different times under 10 mM
23 extracellular glucose (upper right panel) and after addition of IAA (lower left panel)
24 and KCN (lower right panel).

25 (H) Mean relative changes in intracellular ATP (relative YFP/CFP ratio) measured
26 under 10 mM extracellular glucose (grey) and after addition of IAA (yellow) and KCN
27 (blue). Data are expressed as mean \pm s.e.m. The colored bars indicate the time and
28 duration of metabolic inhibitor application. Inset: Histograms summarizing the mean
29 relative changes in intracellular ATP (relative YFP/CFP ratio) ratio under 10 mM
30 extracellular glucose (grey) and after addition of IAA (yellow) and KCN (blue). Data
31 are expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted.

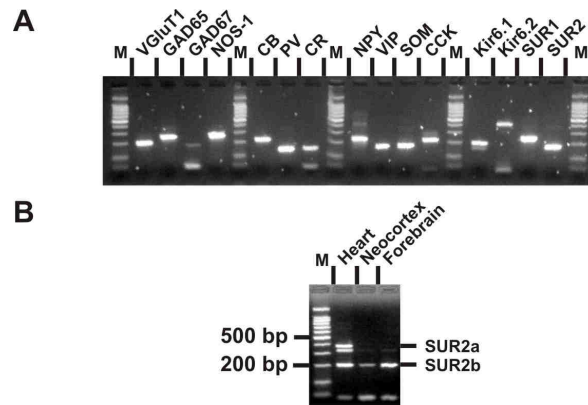
1 **Figure 7. Diagram summarizing the mechanism of lactate-sensing in the**
 2 **cortical network.**



3
 4 Glutamate (Glu) released during synaptic transmission stimulates **1** blood glucose
 5 (Glc) uptake in astrocytes, **2** aerobic glycolysis, **3** lactate release and **4** diffusion
 6 through the astrocytic network. Lactate is then **5** taken up by neurons via
 7 monocarboxylate transporters (MCT) and **6** oxidized into pyruvate by lactate
 8 dehydrogenase (LDH). The ATP produced by pyruvate oxidative metabolism **7**
 9 closes K_{ATP} channels and increases the spiking activity of both pyramidal cells (black)
 10 and inhibitory interneurons (green). The color gradient of the circles represents the
 11 extent of glutamate (black) and lactate (orange) diffusion, respectively. Dashed
 12 arrows indicate multisteps reactions.

13

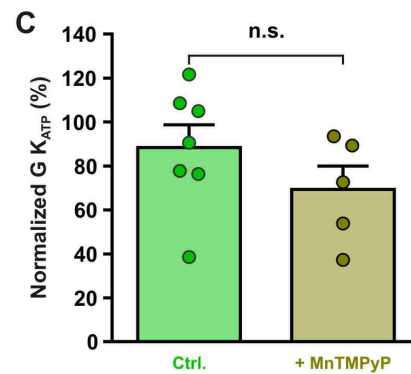
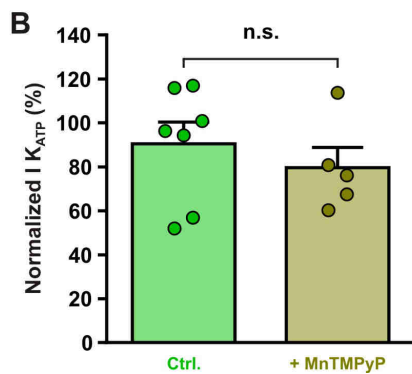
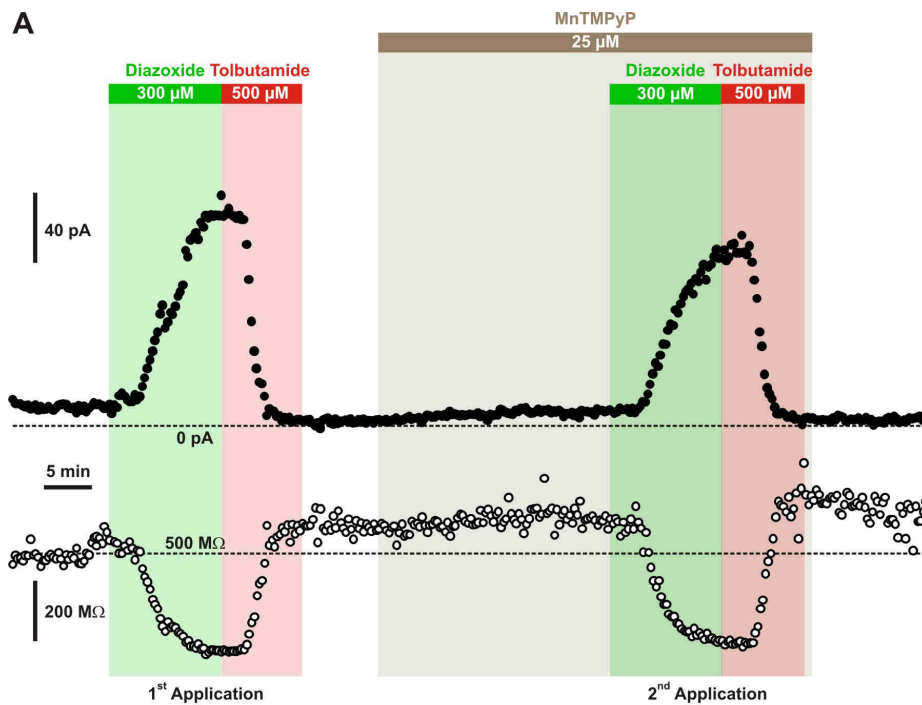
1 **Figure S1. Molecular expression of K_{ATP} channels.**



2
3
4
5
6
7
8

(A) RT-PCR products generated from 500 pg of total cortical RNAs. M: 100 bp ladder molecular weight marker.
(B) SUR2 splice variants-specific RT-PCR analysis of 1 ng total RNAs from rat heart, neocortex and forebrain.

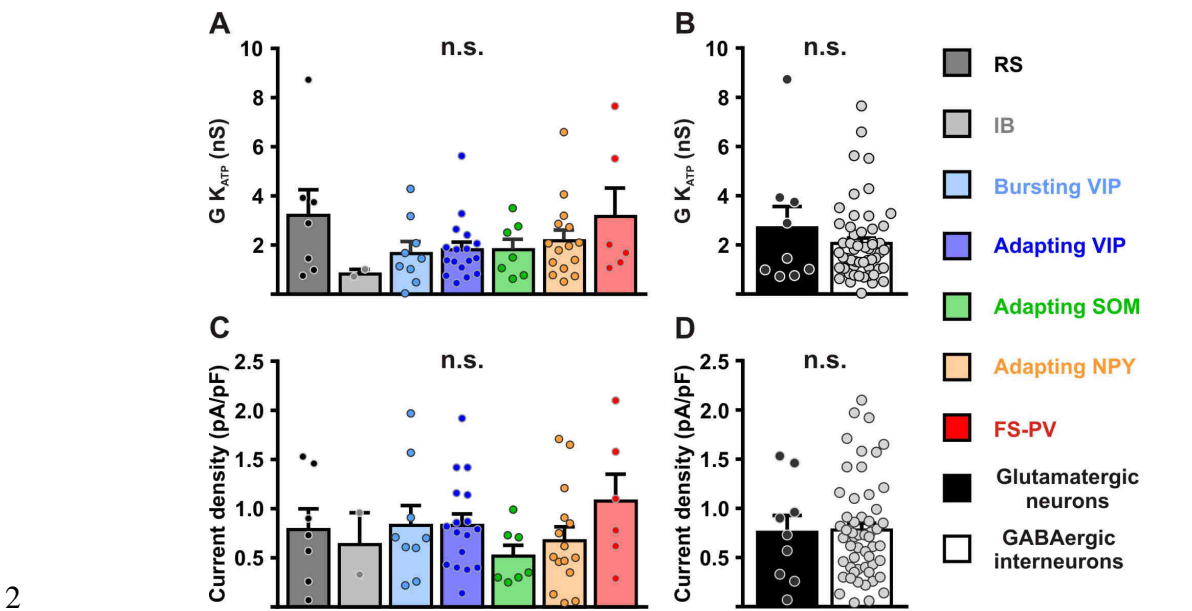
1 **Figure S2. Diazoxide-induced current is independent of ROS production.**



2
3 (A) Representative stationary currents at -60 mV (filled circles) and membrane
4 resistance (open circles) changes induced by diazoxide and tolbutamide under
5 control condition and in presence of the superoxide dismutase and catalase mimetic,
6 MnTMPyP. The colored bars and shaded zones indicate the duration of application.
7 (B-C) Histograms summarizing the relative K_{ATP} currents (B) and relative whole-cell
8 K_{ATP} conductance (C) evoked by two consecutive diazoxide and tolbutamide
9 applications in control condition (Ctrl.) and after the presence of MnTMPyP. Data are
10 normalized by the data measured during first application, expressed as mean \pm
11 s.e.m., and the individual data points are depicted. n.s. not statistically significant.

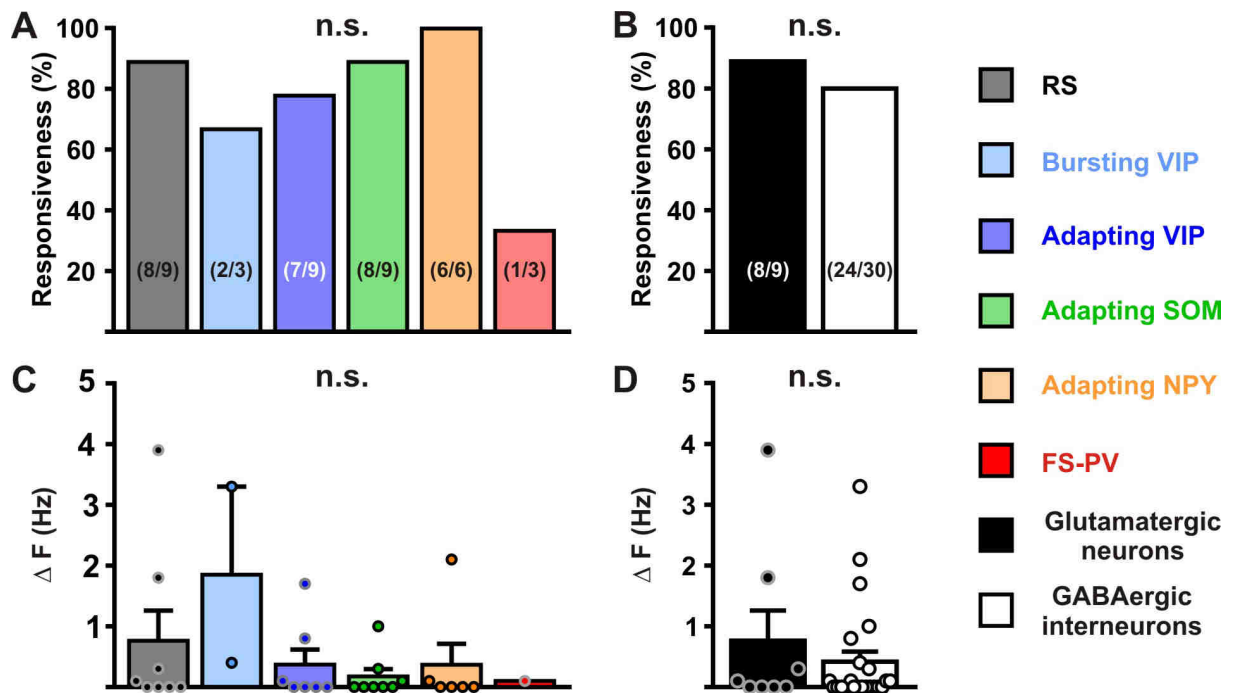
12

1 **Figure S3. Characterization of K_{ATP} channels in different cortical neurons.**



2
 3 (A-D) Histograms summarizing the whole-cell K_{ATP} conductance (A, B) and K_{ATP}
 4 current density (C, D) and K_{ATP} current reversal potential in identified neuronal
 5 subtypes (A,C) or between glutamatergic and GABAergic neurons (B,D). Data are
 6 expressed as mean \pm s.e.m., and the individual data points are depicted. n.s. not
 7 statistically significant.

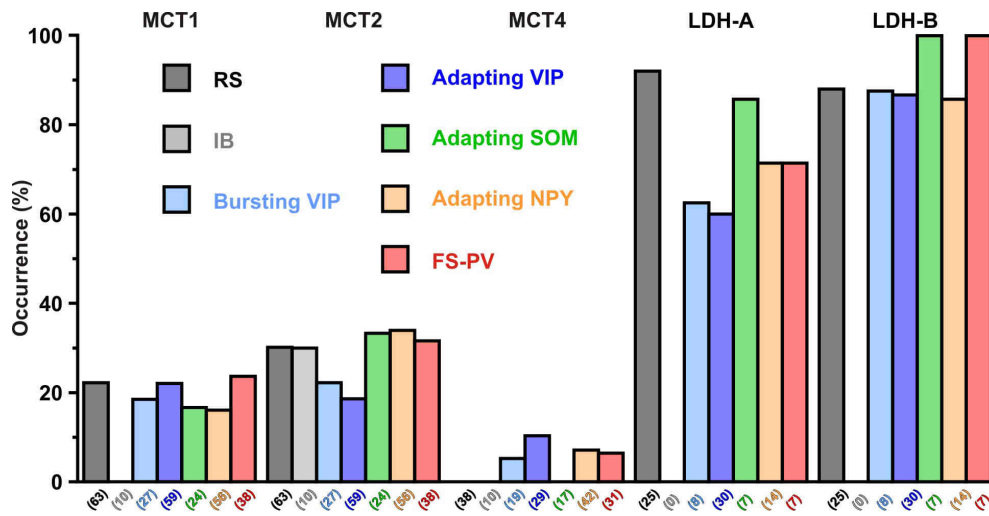
1 **Figure S4. Modulation of neuronal activity in different cortical neurons by K_{ATP}**
 2 **channels.**



3
 4
 5 (A-D) Histograms summarizing the proportion of responsive neurons (A,
 6 $K^2_{(5)}=7.3125$, $p=0.1984$, and B, $p=1.0000$) and modulation firing rate (C, $H_{(5,32)}=$
 7 5.0202 , $p=0.413$, and D, $U_{(8,24)}=87$, $p=0.7169$) by K_{ATP} channels in neuronal subtypes
 8 (A,C) and groups (B,D). The numbers in brackets indicate the number of responsive
 9 cells and analyzed cells, respectively. Data are expressed as mean \pm s.e.m., and the
 10 individual data points are depicted. n.s. not statistically significant.

1 **Figure S5. Expression profile of monocarboxylate transporters and lactate**
 2 **dehydrogenase subunits in different cortical neuronal types.**

3



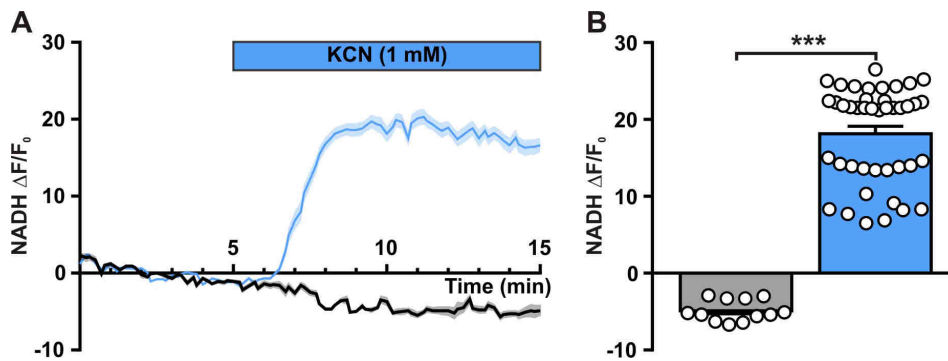
4

5

6 Histograms summarizing the expression profile of the monocarboxylate transporters
 7 MCT1, 2 and 4 and LDH A and B lactate dehydrogenase subunits in different
 8 neuronal subtypes. The numbers in brackets indicate the number of analyzed cells.

9

1 **Figure S6. Neuronal NADH autofluorescence increase by blockade of oxidative**
2 **phosphorylation.**



3
4
5 (A) Mean relative changes in NADH autofluorescence in control condition (grey) and
6 in response to 1 mM KCN (blue). The colored bar indicates the duration of KCN
7 applications. Data are expressed as mean \pm s.e.m.

8 (B) Histograms summarizing the mean relative changes in NADH autofluorescence
9 measured during the last 5 minutes of 1 mM KCN application (blue) and
10 corresponding time in control condition (grey). Data are expressed as mean \pm s.e.m.,
11 and the individual data points are depicted.

1 **References**

2
3

4 Aguilar-Bryan,L., Nichols,C.G., Wechsler,S.W., Clement,J.P., Boyd,A.E., III,
5 Gonzalez,G., Herrera-Sosa,H., Nguy,K., Bryan,J., and Nelson,D.A. (1995). Cloning
6 of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion.
7 *Science* 268, 423-426.

8 Ahmed,K., Tunaru,S., Tang,C., Muller,M., Gille,A., Sassmann,A., Hanson,J., and
9 Offermanns,S. (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent
10 inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab* 11, 311-319.

11 Ainscow,E.K., Mirshamsi,S., Tang,T., Ashford,M.L., and Rutter,G.A. (2002). Dynamic
12 imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic
13 neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. *J.*
14 *Physiol* 544, 429-445.

15 Almeida,A., Almeida,J., Bolanos,J.P., and Moncada,S. (2001). Different responses of
16 astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in
17 astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15294-15299.

18 Ammala,C., Moorhouse,A., and Ashcroft,F.M. (1996). The sulphonylurea receptor
19 confers diazoxide sensitivity on the inwardly rectifying K+ channel Kir6.1 expressed
20 in human embryonic kidney cells. *J. Physiol* 494 (Pt 3), 709-714.

21 Ascoli,G.A., Alonso-Nanclares,L., Anderson,S.A., Barrionuevo,G., avides-
22 Piccione,R., Burkhalter,A., Buzsaki,G., Cauli,B., DeFelipe,J., Fairen,A.,
23 Feldmeyer,D., Fishell,G., Fregnac,Y., Freund,T.F., Gardner,D., Gardner,E.P.,
24 Goldberg,J.H., Helmstaedter,M., Hestrin,S., Karube,F., Kisvarday,Z.F., Lambolez,B.,
25 Lewis,D.A., Marin,O., Markram,H., Munoz,A., Packer,A., Petersen,C.C.,
26 Rockland,K.S., Rossier,J., Rudy,B., Somogyi,P., Staiger,J.F., Tamas,G.,
27 Thomson,A.M., Toledo-Rodriguez,M., Wang,Y., West,D.C., and Yuste,R. (2008).
28 Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the
29 cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557-568.

30 Ashford,M.L., Sturgess,N.C., Trout,N.J., Gardner,N.J., and Hales,C.N. (1988).
31 Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central
32 neurones. *Pflugers Arch.* 412, 297-304.

33 Attwell,D., and Laughlin,S.B. (2001). An energy budget for signaling in the grey
34 matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21, 1133-1145.

35 Aziz,Q., Li,Y., Anderson,N., Ojake,L., Tsisanova,E., and Tinker,A. (2017). Molecular
36 and functional characterization of the endothelial ATP-sensitive potassium channel.
37 *J. Biol. Chem.* 292, 17587-17597.

38 Babenko,A.P., Aguilar-Bryan,L., and Bryan,J. (1998). A view of sur/KIR6.X, KATP
39 channels. *Annu. Rev. Physiol* 60, 667-687.

- 1 Bittar,P.G., Charnay,Y., Pellerin,L., Bouras,C., and Magistretti,P.J. (1996). Selective
2 distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of
3 human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 16, 1079-1089.
- 4 Bondjers,C., He,L., Takemoto,M., Norlin,J., Asker,N., Hellstrom,M., Lindahl,P., and
5 Betsholtz,C. (2006). Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and
6 PDGF-Rbeta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *FASEB J.* 20,
7 1703-1705.
- 8 Bouzier-Sore,A.K., Voisin,P., Bouchaud,V., Bezancon,E., Franconi,J.M., and
9 Pellerin,L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy
10 substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur. J.*
11 *Neurosci.* 24, 1687-1694.
- 12 Bouzier-Sore,A.K., Voisin,P., Canioni,P., Magistretti,P.J., and Pellerin,L. (2003).
13 Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in
14 culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 1298-1306.
- 15 Bozzo,L., Puyal,J., and Chatton,J.Y. (2013). Lactate modulates the activity of primary
16 cortical neurons through a receptor-mediated pathway. *PLoS. ONE.* 8, e71721.
- 17 Broer,S., Broer,A., Schneider,H.P., Stegen,C., Halestrap,A.P., and Deitmer,J.W.
18 (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in
19 *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 341 (Pt 3), 529-535.
- 20 Broer,S., Schneider,H.P., Broer,A., Rahman,B., Hamprecht,B., and Deitmer,J.W.
21 (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus*
22 *laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 167-174.
- 23 Cabezas,C., Irinopoulou,T., Cauli,B., and Ponce,J.C. (2013). Molecular and
24 functional characterization of GAD67-expressing, newborn granule cells in mouse
25 dentate gyrus. *Front Neural Circuits.* 7, 60.
- 26 Cahoy,J.D., Emery,B., Kaushal,A., Foo,L.C., Zamanian,J.L., Christopherson,K.S.,
27 Xing,Y., Lubischer,J.L., Krieg,P.A., Krupenko,S.A., Thompson,W.J., and Barres,B.A.
28 (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a
29 new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28,
30 264-278.
- 31 Cao,R., Higashikubo,B.T., Cardin,J., Knoblich,U., Ramos,R., Nelson,M.T.,
32 Moore,C.I., and Brumberg,J.C. (2009). Pinacidil induces vascular dilation and
33 hyperemia in vivo and does not impact biophysical properties of neurons and
34 astrocytes in vitro. *Cleve. Clin. J. Med.* 76 *Suppl 2*, S80-S85.
- 35 Cauli,B., Audinat,E., Lambolez,B., Angulo,M.C., Ropert,N., Tsuzuki,K., Hestrin,S.,
36 and Rossier,J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal
37 cells. *J. Neurosci.* 17, 3894-3906.
- 38 Cauli,B., Porter,J.T., Tsuzuki,K., Lambolez,B., Rossier,J., Quenet,B., and Audinat,E.
39 (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised
40 clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6144-6149.

- 1 Cauli,B., Tong,X.K., Rancillac,A., Serluca,N., Lambolez,B., Rossier,J., and Hamel,E.
2 (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical
3 vasoactive pathways. *J. Neurosci.* *24*, 8940-8949.
- 4 Cea-del Rio,C.A., Lawrence,J.J., Tricoire,L., Erdelyi,F., Szabo,G., and McBain,C.J.
5 (2010). M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential
6 cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes.
7 *J. Neurosci.* *30*, 6011-6024.
- 8 Chance,B., Cohen,P., Jobsis,F., and Schoener,B. (1962). Intracellular oxidation-
9 reduction states in vivo. *Science* *137*, 499-509.
- 10 Choi,H.B., Gordon,G.R., Zhou,N., Tai,C., Rungta,R.L., Martinez,J., Milner,T.A.,
11 Ryu,J.K., McLarnon,J.G., Tresguerres,M., Levin,L.R., Buck,J., and MacVicar,B.A.
12 (2012). Metabolic Communication between Astrocytes and Neurons via Bicarbonate-
13 Responsive Soluble Adenylyl Cyclase. *Neuron* *75*, 1094-1104.
- 14 Chuquet,J., Quilichini,P., Nimchinsky,E.A., and Buzsaki,G. (2010). Predominant
15 Enhancement of Glucose Uptake in Astrocytes versus Neurons during Activation of
16 the Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* *30*, 15298-15303.
- 17 Chutkow,W.A., Simon,M.C., Le Beau,M.M., and Burant,C.F. (1996). Cloning, tissue
18 expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit
19 of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* *45*, 1439-1445.
- 20 Clarke,D.D., and Sokoloff,L. (1999). Circulation and Energy Metabolism of the Brain.
21 In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, G.J. Siegel, ed.
22 (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 637-669.
- 23 Cunningham,M.O., Pervouchine,D.D., Racca,C., Kopell,N.J., Davies,C.H.,
24 Jones,R.S., Traub,R.D., and Whittington,M.A. (2006). Neuronal metabolism governs
25 cortical network response state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 5597-5601.
- 26 D'Agostino,D.P., Putnam,R.W., and Dean,J.B. (2007). Superoxide ($\cdot\text{O}_2$ -)
27 production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of
28 oxygen. *J. Neurophysiol.*
- 29 de Castro Abrantes H., Briquet,M., Schmuziger,C., Restivo,L., Puyal,J.,
30 Rosenberg,N., Rocher,A.B., Offermanns,S., and Chatton,J.Y. (2019). The lactate
31 receptor HCAR1 modulates neuronal network activity through the activation of
32 Galpha and Gbeta subunits. *J. Neurosci.*
- 33 Devienne,G., Le Gac,B., Piquet,J., and Cauli,B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse
34 Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *J. Vis. Exp.*
- 35 Devor,A., Hillman,E.M., Tian,P., Waeber,C., Teng,I.C., Ruvinskaya,L.,
36 Shalinsky,M.H., Zhu,H., Haslinger,R.H., Narayanan,S.N., Ulbert,I., Dunn,A.K.,
37 Lo,E.H., Rosen,B.R., Dale,A.M., Kleinfeld,D., and Boas,D.A. (2008). Stimulus-
38 induced changes in blood flow and 2-deoxyglucose uptake dissociate in ipsilateral
39 somatosensory cortex. *J. Neurosci.* *28*, 14347-14357.

- 1 Devor,A., Tian,P., Nishimura,N., Teng,I.C., Hillman,E.M., Narayanan,S.N., Ulbert,I.,
2 Boas,D.A., Kleinfeld,D., and Dale,A.M. (2007). Suppressed neuronal activity and
3 concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-
4 dependent signal. *J. Neurosci.* *27*, 4452-4459.
- 5 Dhar-Chowdhury,P., Harrell,M.D., Han,S.Y., Jankowska,D., Parachuru,L.,
6 Morrissey,A., Srivastava,S., Liu,W., Malester,B., Yoshida,H., and Coetzee,W.A.
7 (2005). The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-
8 phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K(ATP) channel
9 macromolecular complex and regulate its function. *J. Biol. Chem.* *280*, 38464-38470.
- 10 Diaz-Garcia,C.M., Lahmann,C., Martinez-Francois,J.R., Li,B., Koveal,D.,
11 Nathwani,N., Rahman,M., Keller,J.P., Marvin,J.S., Looger,L.L., and Yellen,G. (2019).
12 Quantitative in vivo imaging of neuronal glucose concentrations with a genetically
13 encoded fluorescence lifetime sensor. *J. Neurosci. Res.*
- 14 Diaz-Garcia,C.M., Mongeon,R., Lahmann,C., Koveal,D., Zucker,H., and Yellen,G.
15 (2017). Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake.
16 *Cell Metab* *26*, 361-374.
- 17 Dodt,H.U., and Zieglgansberger,W. (1998). Visualization of neuronal form and
18 function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem. J.* *30*, 141-152.
- 19 Droese,S., Brandt,U., and Hanley,P.J. (2006). K⁺-independent actions of diazoxide
20 question the role of inner membrane KATP channels in mitochondrial cytoprotective
21 signaling. *J. Biol. Chem.* *281*, 23733-23739.
- 22 Dufer,M., Krippeit-Drews,P., Buntinas,L., Siemen,D., and Drews,G. (2002). Methyl
23 pyruvate stimulates pancreatic beta-cells by a direct effect on KATP channels, and
24 not as a mitochondrial substrate. *Biochem. J.* *368*, 817-825.
- 25 Dunn-Meynell,A.A., Rawson,N.E., and Levin,B.E. (1998). Distribution and phenotype
26 of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Res.* *814*, 41-
27 54.
- 28 El Hayek L., Khalifeh,M., Zibara,V., Abi,A.R., Emmanuel,N., Karnib,N., El-
29 Ghandour,R., Nasrallah,P., Bilen,M., Ibrahim,P., Younes,J., Abou,H.E., Barmo,N.,
30 Jabre,V., Stephan,J.S., and Sleiman,S.F. (2019). Lactate Mediates the Effects of
31 Exercise on Learning and Memory through SIRT1-Dependent Activation of
32 Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *J. Neurosci.* *39*, 2369-
33 2382.
- 34 Fan,Y., Kong,H., Ye,X., Ding,J., and Hu,G. (2016). ATP-sensitive potassium
35 channels: uncovering novel targets for treating depression. *Brain Struct. Funct.* *221*,
36 3111-3122.
- 37 Férézou,I., Cauli,B., Hill,E.L., Rossier,J., Hamel,E., and Lambolez,B. (2002). 5-HT₃
38 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive
39 intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* *22*, 7389-7397.

- 1 Férézou,I., Hill,E.L., Cauli,B., Gibelin,N., Kaneko,T., Rossier,J., and Lambolez,B.
2 (2007). Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical
3 interneurons. *Cereb. Cortex* *17*, 1948-1957.
- 4 Galeffi,F., Foster,K.A., Sadgrove,M.P., Beaver,C.J., and Turner,D.A. (2007). Lactate
5 uptake contributes to the NAD(P)H biphasic response and tissue oxygen response
6 during synaptic stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.*
7 *103*, 2449-2461.
- 8 Gallopin,T., Geoffroy,H., Rossier,J., and Lambolez,B. (2006). Cortical sources of
9 CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb.*
10 *Cortex* *16*, 1440-1452.
- 11 Galow,L.V., Schneider,J., Lewen,A., Ta,T.T., Papageorgiou,I.E., and Kann,O. (2014).
12 Energy substrates that fuel fast neuronal network oscillations. *Front Neurosci.* *8*, 398.
- 13 German,M.S. (1993). Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of
14 glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 1781-
15 1785.
- 16 Gimenez-Cassina,A., Martinez-Francois,J.R., Fisher,J.K., Szlyk,B., Polak,K.,
17 Wiwczar,J., Tanner,G.R., Lutas,A., Yellen,G., and Danial,N.N. (2012). BAD-
18 Dependent Regulation of Fuel Metabolism and K(ATP) Channel Activity Confers
19 Resistance to Epileptic Seizures. *Neuron* *74*, 719-730.
- 20 Girouard,H., Bonev,A.D., Hannah,R.M., Meredith,A., Aldrich,R.W., and Nelson,M.T.
21 (2010). Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation
22 and constriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 3811-3816.
- 23 Gribble,F.M., Ashfield,R., Ammala,C., and Ashcroft,F.M. (1997). Properties of cloned
24 ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol* *498* (Pt 1), 87-
25 98.
- 26 Gulyas,A.I., Buzsaki,G., Freund,T.F., and Hirase,H. (2006). Populations of
27 hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur. J.*
28 *Neurosci.* *23*, 2581-2594.
- 29 Gupta,A., Wang,Y., and Markram,H. (2000). Organizing principles for a diversity of
30 GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* *287*, 273-278.
- 31 Haj-Dahmane,S., and Andrade,R. (1997). Calcium-activated cation nonselective
32 current contributes to the fast afterdepolarization in rat prefrontal cortex neurons. *J.*
33 *Neurophysiol.* *78*, 1983-1989.
- 34 Halabisky,B.E., Shen,F., Huguenard,J.R., and Prince,D.A. (2006).
35 Electrophysiological Classification of Somatostatin-positive Interneurons in Mouse
36 Sensorimotor Cortex. *J. Neurophysiol.*
- 37 Hall,C.N., Klein-Flugge,M.C., Howarth,C., and Attwell,D. (2012). Oxidative
38 phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms
39 underlying brain information processing. *J. Neurosci.* *32*, 8940-8951.

- 1 Heron-Milhavet,L., Xue-Jun,Y., Vannucci,S.J., Wood,T.L., Willing,L.B., Stannard,B.,
2 Hernandez-Sanchez,C., Mobbs,C., Virsolvy,A., and LeRoith,D. (2004). Protection
3 against hypoxic-ischemic injury in transgenic mice overexpressing Kir6.2 channel
4 pore in forebrain. *Mol. Cell Neurosci.* *25*, 585-593.
- 5 Hill,E.L., Gallopin,T., Férézou,I., Cauli,B., Rossier,J., Schweitzer,P., and Lambolez,B.
6 (2007). Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic
7 and glutamatergic neurons. *J. Neurophysiol.* *97*, 2580-2589.
- 8 Houades,V., Koulakoff,A., Ezan,P., Seif,I., and Giaume,C. (2008). Gap junction-
9 mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* *28*, 5207-5217.
- 10 Hu,Y., and Wilson,G.S. (1997a). A temporary local energy pool coupled to neuronal
11 activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-
12 response enzyme-based sensor. *J. Neurochem.* *69*, 1484-1490.
- 13 Hu,Y., and Wilson,G.S. (1997b). Rapid changes in local extracellular rat brain
14 glucose observed with an in vivo glucose sensor. *J. Neurochem.* *68*, 1745-1752.
- 15 Imamura,H., Nhat,K.P., Togawa,H., Saito,K., Iino,R., Kato-Yamada,Y., Nagai,T., and
16 Noji,H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence
17 resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad.*
18 *Sci. U. S. A* *106*, 15651-15656.
- 19 Inagaki,N., Gono,T., Clement,J.P., Namba,N., Inazawa,J., Gonzalez,G., Aguilar-
20 Bryan,L., Seino,S., and Bryan,J. (1995a). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier
21 subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* *270*, 1166-1170.
- 22 Inagaki,N., Gono,T., Clement,J.P., Wang,C.Z., Aguilar-Bryan,L., Bryan,J., and
23 Seino,S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological
24 properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* *16*, 1011-1017.
- 25 Inagaki,N., Tsuura,Y., Namba,N., Masuda,K., Gono,T., Horie,M., Seino,Y.,
26 Mizuta,M., and Seino,S. (1995b). Cloning and functional characterization of a novel
27 ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including
28 pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* *270*, 5691-5694.
- 29 Isomoto,S., Kondo,C., Yamada,M., Matsumoto,S., Higashiguchi,O., Horio,Y.,
30 Matsuzawa,Y., and Kurachi,Y. (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR
31 (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* *271*, 24321-
32 24324.
- 33 Isomoto,S., and Kurachi,Y. (1997). Function, regulation, pharmacology, and
34 molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J.*
35 *Cardiovasc. Electrophysiol.* *8*, 1431-1446.
- 36 Ivanov,A.I., Malkov,A.E., Waseem,T., Mukhtarov,M., Buldakova,S., Gubkina,O.,
37 Zilberter,M., and Zilberter,Y. (2014). Glycolysis and oxidative phosphorylation in
38 neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices. *J. Cereb.*
39 *Blood Flow Metab* *34*, 397-407.

- 1 Jimenez-Blasco,D., Busquets-Garcia,A., Hebert-Chatelain,E., Serrat,R., Vicente-
2 Gutierrez,C., Ioannidou,C., Gomez-Sotres,P., Lopez-Fabuel,I., Resch-Beusher,M.,
3 Resel,E., Arnouil,D., Saraswat,D., Varilh,M., Cannich,A., Julio-Kalajzic,F., Bonilla-
4 Del,R., I, Almeida,A., Puente,N., Achicallende,S., Lopez-Rodriguez,M.L., Jolle,C.,
5 Deglon,N., Pellerin,L., Josephine,C., Bonvento,G., Panatier,A., Lutz,B., Piazza,P.V.,
6 Guzman,M., Bellocchio,L., Bouzier-Sore,A.K., Grandes,P., Bolanos,J.P., and
7 Marsicano,G. (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to
8 cannabinoid effects. *Nature*.
- 9 Kann,O., Papageorgiou,I.E., and Draguhn,A. (2014). Highly energized inhibitory
10 interneurons are a central element for information processing in cortical networks. *J.*
11 *Cereb. Blood Flow Metab* *34*, 1270-1282.
- 12 Karagiannis,A., Gallopin,T., David,C., Battaglia,D., Geoffroy,H., Rossier,J.,
13 Hillman,E.M., Staiger,J.F., and Cauli,B. (2009). Classification of NPY-expressing
14 neocortical interneurons. *J. Neurosci.* *29*, 3642-3659.
- 15 Karagiannis,A., Sylantyev,S., Hadjihambi,A., Hosford,P.S., Kasparov,S., and
16 Gourine,A.V. (2015). Hemichannel-mediated release of lactate. *J. Cereb. Blood Flow*
17 *Metab*.
- 18 Karschin,C., Ecke,C., Ashcroft,F.M., and Karschin,A. (1997). Overlapping distribution
19 of K(ATP) channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in
20 rodent brain. *FEBS Lett.* *401*, 59-64.
- 21 Kawaguchi,Y. (1993). Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific
22 physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.*
23 *69*, 416-431.
- 24 Kawaguchi,Y. (1995). Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific
25 morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.* *15*, 2638-
26 2655.
- 27 Kawamura,M., Jr., Ruskin,D.N., and Masino,S.A. (2010). Metabolic Autocrine
28 Regulation of Neurons Involves Cooperation among Pannexin Hemichannels,
29 Adenosine Receptors, and KATP Channels. *J. Neurosci.* *30*, 3886-3895.
- 30 Krawchuk,M.B., Ruff,C.F., Yang,X., Ross,S.E., and Vazquez,A.L. (2019).
31 Optogenetic assessment of VIP, PV, SOM and NOS inhibitory neuron activity and
32 cerebral blood flow regulation in mouse somato-sensory cortex
33 1. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 271678X19870105.
- 34 Lacroix,A., Toussay,X., Anenberg,E., Lecrux,C., Ferreiros,N., Karagiannis,A.,
35 Plaisier,F., Chausson,P., Jarlier,F., Burgess,S.A., Hillman,E.M., Tegeder,I.,
36 Murphy,T.H., Hamel,E., and Cauli,B. (2015). COX-2-Derived Prostaglandin E2
37 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the
38 Rodent Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *35*, 11791-11810.
- 39 Lambolez,B., Audinat,E., Bochet,P., Crepel,F., and Rossier,J. (1992). AMPA receptor
40 subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* *9*, 247-258.

- 1 Laughton,J.D., Charnay,Y., Belloir,B., Pellerin,L., Magistretti,P.J., and Bouras,C.
2 (2000). Differential messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and
3 LDH-5 isoforms in the rat brain. *Neuroscience* 96, 619-625.
- 4 Lauritzen,K.H., Morland,C., Puchades,M., Holm-Hansen,S., Hagelin,E.M.,
5 Lauritzen,F., Attramadal,H., Storm-Mathisen,J., Gjedde,A., and Bergersen,L.H.
6 (2014). Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and
7 brain energy metabolism. *Cereb. Cortex* 24, 2784-2795.
- 8 Le Douce J., Maugard,M., Veran,J., Matos,M., Jego,P., Vigneron,P.A., Faivre,E.,
9 Toussay,X., Vandenberghe,M., Balbastre,Y., Piquet,J., Guiot,E., Tran,N.T.,
10 Taverna,M., Marinesco,S., Koyanagi,A., Furuya,S., Gaudin-Guerif,M., Goutal,S.,
11 Ghetas,A., Pruvost,A., Bemelmans,A.P., Gaillard,M.C., Cambon,K., Stimmer,L.,
12 Sazdovitch,V., Duyckaerts,C., Knott,G., Herard,A.S., Delzescaux,T., Hantraye,P.,
13 Brouillet,E., Cauli,B., Oliet,S.H.R., Panatier,A., and Bonvento,G. (2020). Impairment
14 of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive
15 Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab* 31, 503-517.
- 16 Lee,K.P.K., Chen,J., and MacKinnon,R. (2017). Molecular structure of human KATP
17 in complex with ATP and ADP. *Elife*. 6.
- 18 Lee,Y., Morrison,B.M., Li,Y., Lengacher,S., Farah,M.H., Hoffman,P.N., Liu,Y.,
19 Tsingalia,A., Jin,L., Zhang,P.W., Pellerin,L., Magistretti,P.J., and Rothstein,J.D.
20 (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to
21 neurodegeneration. *Nature*.
- 22 Lemak,M.S., Voloshanencko,O., Draguhn,A., and Egorov,A.V. (2014). KATP channels
23 modulate intrinsic firing activity of immature entorhinal cortex layer III neurons. *Front*
24 *Cell Neurosci.* 8, 255.
- 25 Lennie,P. (2003). The cost of cortical computation. *Curr. Biol.* 13, 493-497.
- 26 Lerchundi,R., Fernandez-Moncada,I., Contreras-Baeza,Y., Sotelo-Hitschfeld,T.,
27 Machler,P., Wyss,M.T., Stobart,J., Baeza-Lehnert,F., Alegria,K., Weber,B., and
28 Barros,L.F. (2015). NH₄⁺ triggers the release of astrocytic lactate via mitochondrial
29 pyruvate shunting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- 30 Li,N., Wu,J.X., Ding,D., Cheng,J., Gao,N., and Chen,L. (2017). Structure of a
31 Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. *Cell* 168, 101-110.
- 32 Liss,B., Bruns,R., and Roeper,J. (1999). Alternative sulfonylurea receptor expression
33 defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons.
34 *EMBO J.* 18, 833-846.
- 35 Logothetis,N.K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*
36 453, 869-878.
- 37 Lundgaard,I., Li,B., Xie,L., Kang,H., Sanggaard,S., Haswell,J.D., Sun,W.,
38 Goldman,S., Blekot,S., Nielsen,M., Takano,T., Deane,R., and Nedergaard,M. (2015).
39 Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral
40 metabolism. *Nat. Commun.* 6, 6807.

- 1 Machler,P., Wyss,M.T., Elsayed,M., Stobart,J., Gutierrez,R., von Faber-Castell,A.,
2 Kaelin,V., Zuend,M., San,M.A., Romero-Gomez,I., Baeza-Lehnert,F., Lengacher,S.,
3 Schneider,B.L., Aebischer,P., Magistretti,P.J., Barros,L.F., and Weber,B. (2016). In
4 Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metab* 23, 94-
5 102.
- 6 Magistretti,P.J., and Allaman,I. (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-
7 product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 235-249.
- 8 Martin,G.M., Yoshioka,C., Rex,E.A., Fay,J.F., Xie,Q., Whorton,M.R., Chen,J.Z., and
9 Shyng,S.L. (2017). Cryo-EM structure of the ATP-sensitive potassium channel
10 illuminates mechanisms of assembly and gating. *Elife.* 6.
- 11 Miki,T., Liss,B., Minami,K., Shiuchi,T., Saraya,A., Kashima,Y., Horiuchi,M.,
12 Ashcroft,F., Minokoshi,Y., Roeper,J., and Seino,S. (2001). ATP-sensitive K⁺
13 channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose
14 homeostasis. *Nat. Neurosci.* 4, 507-512.
- 15 Miki,T., Nagashima,K., Tashiro,F., Kotake,K., Yoshitomi,H., Tamamoto,A., Gono,T.,
16 Iwanaga,T., Miyazaki,J., and Seino,S. (1998). Defective insulin secretion and
17 enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*
18 *A* 95, 10402-10406.
- 19 Molnar,G., Farago,N., Kocsis,A.K., Rozsa,M., Lovas,S., Boldog,E., Baldi,R.,
20 Csajbok,E., Gardi,J., Puskas,L.G., and Tamas,G. (2014). GABAergic neurogliaform
21 cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 1133-
22 1137.
- 23 Moreau,C., Prost,A.L., Derand,R., and Vivaudou,M. (2005). SUR, ABC proteins
24 targeted by KATP channel openers. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38, 951-963.
- 25 Newgard,C.B., and McGarry,J.D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic
26 beta-cell signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 689-719.
- 27 Ogawa,M., Watabe,H., Teramoto,N., Miyake,Y., Hayashi,T., Iida,H., Murata,T., and
28 Magata,Y. (2005). Understanding of cerebral energy metabolism by dynamic living
29 brain slice imaging system with [18F]FDG. *Neurosci. Res.* 52, 357-361.
- 30 Okuyama,Y., Yamada,M., Kondo,C., Satoh,E., Isomoto,S., Shindo,T., Horio,Y.,
31 Kitakaze,M., Hori,M., and Kurachi,Y. (1998). The effects of nucleotides and
32 potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K⁺ channel expressed in
33 a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflugers Arch.* 435, 595-603.
- 34 Pellerin,L., and Magistretti,P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates
35 aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.
36 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625-9.
- 37 Perrenoud,Q., Geoffroy,H., Gauthier,B., Rancillac,A., Alfonsi,F., Kessarar,N.,
38 Rossier,J., Vitalis,T., and Gallopin,T. (2012). Characterization of Type I and Type II
39 nNOS-Expressing Interneurons in the Barrel Cortex of Mouse. *Front Neural Circuits.*
40 6, 36.

- 1 Piquet,J., Toussay,X., Hepp,R., Lerchundi,R., Le,D.J., Faivre,E., Guiot,E.,
2 Bonvento,G., and Cauli,B. (2018). Supragranular Pyramidal Cells Exhibit Early
3 Metabolic Alterations in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front*
4 *Cell Neurosci.* *12*, 216.
- 5 Prichard,J., Rothman,D., Novotny,E., Petroff,O., Kuwabara,T., Avison,M.,
6 Howseman,A., Hanstock,C., and Shulman,R. (1991). Lactate rise detected by ¹H
7 NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*
8 *S. A* *88*, 5829-5831.
- 9 Puljung,M.C. (2018). Cryo-electron microscopy structures and progress toward a
10 dynamic understanding of KATP channels. *J. Gen. Physiol* *150*, 653-669.
- 11 Pullen,T.J., da,S., X, Kelsey,G., and Rutter,G.A. (2011). miR-29a and miR-29b
12 contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1
13 (Mct1). *Mol. Cell Biol.* *31*, 3182-3194.
- 14 Quistorff,B., Secher,N.H., and Van Lieshout,J.J. (2008). Lactate fuels the human
15 brain during exercise. *FASEB J.* *22*, 3443-3449.
- 16 Raichle,M.E., and Mintun,M.A. (2006). Brain work and brain imaging. *Annu. Rev.*
17 *Neurosci.* *29*, 449-476.
- 18 Rouach,N., Koulakoff,A., Abudara,V., Willecke,K., and Giaume,C. (2008). Astroglial
19 metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* *322*, 1551-
20 1555.
- 21 Ruminot,I., Gutierrez,R., Pena-Munzenmayer,G., Anazco,C., Sotelo-Hitschfeld,T.,
22 Lerchundi,R., Niemeyer,M.I., Shull,G.E., and Barros,L.F. (2011). NBCe1 Mediates
23 the Acute Stimulation of Astrocytic Glycolysis by Extracellular K⁺. *J. Neurosci.* *31*,
24 14264-14271.
- 25 Sada,N., Lee,S., Katsu,T., Otsuki,T., and Inoue,T. (2015). Epilepsy treatment.
26 Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* *347*,
27 1362-1367.
- 28 Sakura,H., Ammala,C., Smith,P.A., Gribble,F.M., and Ashcroft,F.M. (1995). Cloning
29 and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium
30 channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle.
31 *FEBS Lett.* *377*, 338-344.
- 32 Saunders,A., Macosko,E.Z., Wysoker,A., Goldman,M., Krienen,F.M., de,R.H.,
33 Bien,E., Baum,M., Bortolin,L., Wang,S., Goeva,A., Nemesh,J., Kamitaki,N.,
34 Brumbaugh,S., Kulp,D., and McCarroll,S.A. (2018). Molecular Diversity and
35 Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* *174*, 1015-1030.
- 36 Schindelin,J., rganda-Carreras,I., Frise,E., Kaynig,V., Longair,M., Pietzsch,T.,
37 Preibisch,S., Rueden,C., Saalfeld,S., Schmid,B., Tinevez,J.Y., White,D.J.,
38 Hartenstein,V., Eliceiri,K., Tomancak,P., and Cardona,A. (2012). Fiji: an open-source
39 platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676-682.

- 1 Schurr,A., Miller,J.J., Payne,R.S., and Rigor,B.M. (1999). An increase in lactate
2 output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated
3 neurons. *J. Neurosci.* *19*, 34-39.
- 4 Schurr,A., West,C.A., and Rigor,B.M. (1988). Lactate-supported synaptic function in
5 the rat hippocampal slice preparation. *Science* *240*, 1326-1328.
- 6 Sekine,N., Cirulli,V., Regazzi,R., Brown,L.J., Gine,E., Tamarit-Rodriguez,J.,
7 Girotti,M., Marie,S., MacDonald,M.J., Wollheim,C.B., and . (1994). Low lactate
8 dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in
9 pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J. Biol. Chem.* *269*, 4895-
10 4902.
- 11 Shmuel,A., Augath,M., Oeltermann,A., and Logothetis,N.K. (2006). Negative
12 functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey
13 visual area V1. *Nat. Neurosci.* *9*, 569-577.
- 14 Shmuel,A., Yacoub,E., Pfeuffer,J., Van de Moortele,P.F., Adriany,G., Hu,X., and
15 Ugurbil,K. (2002). Sustained negative BOLD, blood flow and oxygen consumption
16 response and its coupling to the positive response in the human brain. *Neuron* *36*,
17 1195-1210.
- 18 Silver,I.A., and Erecinska,M. (1994). Extracellular glucose concentration in
19 mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal
20 activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic
21 animals. *J. Neurosci.* *14*, 5068-5076.
- 22 Song,Z., and Routh,V.H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on
23 glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* *54*, 15-22.
- 24 Sotelo-Hitschfeld,T., Niemeyer,M.I., Machler,P., Ruminot,I., Lerchundi,R., Wyss,M.T.,
25 Stobart,J., Fernandez-Moncada,I., Valdebenito,R., Garrido-Gerter,P., Contreras-
26 Baeza,Y., Schneider,B.L., Aebischer,P., Lengacher,S., San,M.A., Le,D.J.,
27 Bonvento,G., Magistretti,P.J., Sepulveda,F.V., Weber,B., and Barros,L.F. (2015).
28 Channel-mediated lactate release by k⁺-stimulated astrocytes. *J. Neurosci.* *35*, 4168-
29 4178.
- 30 Stella,N., Schweitzer,P., and Piomelli,D. (1997). A second endogenous cannabinoid
31 that modulates long-term potentiation. *Nature* *388*, 773-778.
- 32 Sun,H.S., Feng,Z.P., Miki,T., Seino,S., and French,R.J. (2006). Enhanced neuronal
33 damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive K⁺
34 channels. *J. Neurophysiol.* *95*, 2590-2601.
- 35 Suzuki,A., Stern,S.A., Bozdagi,O., Huntley,G.W., Walker,R.H., Magistretti,P.J., and
36 Alberini,C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term
37 memory formation. *Cell* *144*, 810-823.
- 38 Tanner,G.R., Lutas,A., Martinez-Francois,J.R., and Yellen,G. (2011). Single K ATP
39 channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule
40 neurons. *J. Neurosci.* *31*, 8689-8696.

- 1 Tantama,M., Martinez-Francois,J.R., Mongeon,R., and Yellen,G. (2013). Imaging
2 energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP
3 ratio. *Nat. Commun.* 4, 2550.
- 4 Tarasov,A.I., Girard,C.A., and Ashcroft,F.M. (2006). ATP sensitivity of the ATP-
5 sensitive K⁺ channel in intact and permeabilized pancreatic beta-cells. *Diabetes* 55,
6 2446-2454.
- 7 Tasic,B., Menon,V., Nguyen,T.N., Kim,T.K., Jarsky,T., Yao,Z., Levi,B., Gray,L.T.,
8 Sorensen,S.A., Dolbeare,T., Bertagnolli,D., Goldy,J., Shapovalova,N., Parry,S.,
9 Lee,C., Smith,K., Bernard,A., Madisen,L., Sunkin,S.M., Hawrylycz,M., Koch,C., and
10 Zeng,H. (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell
11 transcriptomics. *Nat. Neurosci.*
- 12 Thevenaz,P., Ruttimann,U.E., and Unser,M. (1998). A pyramid approach to subpixel
13 registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process* 7, 27-41.
- 14 Thoby-Brisson,M., Cauli,B., Champagnat,J., Fortin,G., and Katz,D.M. (2003).
15 Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory
16 neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *J. Neurosci.* 23, 7685-7689.
- 17 Thomzig,A., Laube,G., Pruss,H., and Veh,R.W. (2005). Pore-forming subunits of K-
18 ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and
19 cellular distribution in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 484, 313-330.
- 20 Tsuzuki,K., Lambolez,B., Rossier,J., and Ozawa,S. (2001). Absolute quantification of
21 AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 77,
22 1650-1659.
- 23 Uhlirova,H., Kilic,K., Tian,P., Thunemann,M., Desjardins,M., Saisan,P.A.,
24 Sakadzic,S., Ness,T.V., Mateo,C., Cheng,Q., Weldy,K.L., Razoux,F.,
25 Vanderberghe,M., Cremonesi,J.A., Ferri,C.G., Nizar,K., Sridhar,V.B., Steed,T.C.,
26 Abashin,M., Fainman,Y., Masliah,E., Djurovic,S., Andreassen,O., Silva,G.A.,
27 Boas,D.A., Kleinfeld,D., Buxton,R.B., Einevoll,G.T., Dale,A.M., and Devor,A. (2016).
28 Cell type specificity of neurovascular coupling in cerebral cortex. *Elife.* 5.
- 29 Vanlandewijck,M., He,L., Mae,M.A., Andrae,J., Ando,K., Del,G.F., Nahar,K.,
30 Lebouvier,T., Lavina,B., Gouveia,L., Sun,Y., Raschperger,E., Rasanen,M., Zarb,Y.,
31 Mochizuki,N., Keller,A., Lendahl,U., and Betsholtz,C. (2018). A molecular atlas of cell
32 types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554, 475-480.
- 33 Varin,C., Rancillac,A., Geoffroy,H., Arthaud,S., Fort,P., and Gallopin,T. (2015).
34 Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the
35 Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism. *J.*
36 *Neurosci.* 35, 9900-9911.
- 37 Vezzoli,E., Cali,C., De,R.M., Ponzoni,L., Sogne,E., Gagnon,N., Francolini,M.,
38 Braidà,D., Sala,M., Müller,D., Falqui,A., and Magistretti,P.J. (2020). Ultrastructural
39 Evidence for a Role of Astrocytes and Glycogen-Derived Lactate in Learning-
40 Dependent Synaptic Stabilization. *Cereb. Cortex* 30, 2114-2127.

- 1 Voutsinos-Porche,B., Bonvento,G., Tanaka,K., Steiner,P., Welker,E., Chatton,J.Y.,
2 Magistretti,P.J., and Pellerin,L. (2003). Glial glutamate transporters mediate a
3 functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse
4 developing cortex. *Neuron* 37, 275-286.
- 5 Ward,J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of*
6 *the American Statistical Association* 58, 236-244.
- 7 Wilson,J.E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular
8 localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049-2057.
- 9 Wyss,M.T., Jolivet,R., Buck,A., Magistretti,P.J., and Weber,B. (2011). In vivo
10 evidence for lactate as a neuronal energy source. *J. Neurosci.* 31, 7477-7485.
- 11 Xi,Q., Cheranov,S.Y., and Jaggar,J.H. (2005). Mitochondria-derived reactive oxygen
12 species dilate cerebral arteries by activating Ca²⁺ sparks. *Circ. Res.* 97, 354-362.
- 13 Yamada,M., Isomoto,S., Matsumoto,S., Kondo,C., Shindo,T., Horio,Y., and
14 Kurachi,Y. (1997). Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-
15 sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J. Physiol* 499 (Pt 3), 715-720.
- 16 Yang,X.J., Kow,L.M., Funabashi,T., and Mobbs,C.V. (1999). Hypothalamic glucose
17 sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms.
18 *Diabetes* 48, 1763-1772.
- 19 Zawar,C., and Neumcke,B. (2000). Differential activation of ATP-sensitive potassium
20 channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat
21 hippocampus. *Pflügers Arch.* 439, 256-262.
- 22 Zawar,C., Plant,T.D., Schirra,C., Konnerth,A., and Neumcke,B. (1999). Cell-type
23 specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J.*
24 *Physiol* 514 (Pt 2), 327-341.
- 25 Zeisel,A., Machado,A.B., Codeluppi,S., Lonnerberg,P., La,M.G., Jureus,A.,
26 Marques,S., Munguba,H., He,L., Betsholtz,C., Rolny,C., Castelo-Branco,G., Hjerling-
27 Leffler,J., and Linnarsson,S. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus
28 revealed by single-cell RNA-seq. *Science*.
29
30

Rôle du canal calcique à bas-seuil Cav3.2 dans les mécanismes centraux des douleurs chroniques

Article en préparation

Les mécanismes moléculaires à l'origine des douleurs chroniques sont largement méconnus alors même que ces pathologies affectent 1.5 milliards d'individus dans le monde. L'un des principaux axes de recherche concerne le rôle des canaux ioniques dans l'établissement et/ou le maintien des phénomènes douloureux. Parmi ces canaux, le canal calcique à bas-seuil de type Cav3.2 est un candidat privilégié. Un ensemble de travaux a en effet montré son effet pro-nociceptif dans les neurones sensoriels périphériques (Bourinet et al., 2016), en revanche, son implication dans les neurones supra-spinaux n'avait jamais été étudiée.

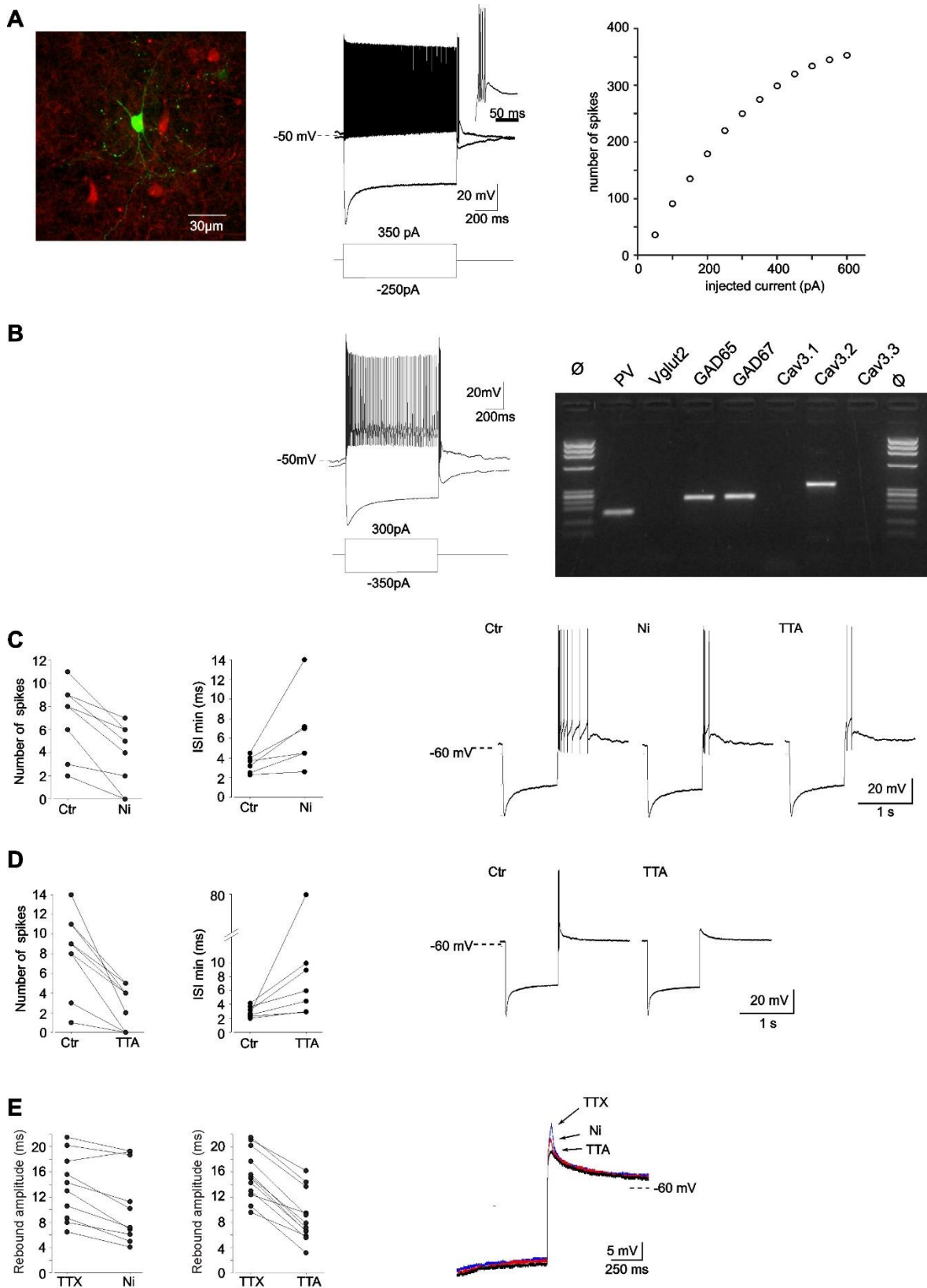
Grâce à un modèle murin chez lequel le canal Cav3.2 peut être localisé, grâce à l'insertion d'une GFP dans une boucle extracellulaire, et spécifiquement délété par la Cre-recombinase (lignée KI-Cav3.2-eGFPflox (KI) (Francois et al., 2015), l'équipe de recherche avec laquelle j'ai collaboré a montré une forte expression de ce canal dans le noyau prétectal antérieur (APN). Dans ce noyau le canal Cav3.2 est presque exclusivement localisé dans les neurones à parvalbumine (PV). L'APN est un carrefour de connectivité ascendante et descendante du système somatosensoriel connu pour être impliqué dans la perception douloureuse. Il a en particulier été montré que les stimulations électriques ou chimiques de l'APN ont des effets antinociceptifs alors que son inactivation augmente la réponse aux stimulations douloureuses (Rees and Roberts, 1993).

Pour étudier si ce canal Cav3.2 de l'APN contribue à la perception somatosensorielle basale et neuropathique, mes collègues ont utilisé des tests de sensibilité tactile avant et après lésion du nerf sciatique (SNI) chez des souris KI contrôle ou ayant subi une délétion du canal. Ils ont ainsi montré que la délétion du canal Cav3.2 dans l'APN réduit significativement le développement de l'allodynie mécanique induit par SNI.

Afin de comprendre comment l'excitabilité des neurones de l'APN est contrôlée par le canal Cav3.2, et ultérieurement comment celle-ci peut être modifiée en situation de douleur chronique, mes collègues ont entrepris une caractérisation des neurones PV sur des tranches d'APN préparées à partir des souris de la lignée PVCrxAl14. J'ai participé à une partie de cette étude et montré grâce à une analyse de RT-PCR multiplex sur cellule unique, que les neurones

PV de l'APN présentent un profil de décharge de type « *fast spiking* » et sont majoritairement GABAergiques (figure A & B). De plus, l'isoforme Cav3.2 est exclusivement exprimée dans ces neurones GABAergiques où elle est fréquemment co-exprimée avec les autres isoformes des canaux T, l'isoforme Cav3.1, voire Cav3.3. En utilisant le TTA-P2, un bloquant spécifique de l'ensemble des canaux T, ou en bloquant spécifiquement l'isoforme Cav3.2 par l'application de faibles concentrations de Ni²⁺ (100µM) mes collègues ont montré que l'isoforme 3.2 contribue à l'émission de décharges en bouffées de potentiels d'action (figure C-E).

En parallèle des enregistrements *in vivo* de l'activité des neurones PV de l'APN ont montré une augmentation du taux de décharges en bouffées chez des souris SNI par rapport aux souris contrôles. L'ensemble de ces données suggère que le canal Cav3.2 pourrait jouer un rôle essentiel dans les mécanismes centraux de douleur chronique en favorisant la survenue d'activité à hautes fréquences dans une sous-population GABAergiques de neurones de l'APN.



Electrophysiological characterization of PV+ APT neurons recorded in PVCre/AI14 mice.

A – Typical recordings of PV+ APT neuron activities. Left image shows the recorded neuron, which was filled with biocytine (green cell). Neurons in red are non-recorded PV+ neurons. Middle traces present the

characteristic fast spiking activity evoked by depolarizing current injection and the pronounced sag due to h current activation upon hyperpolarization. Note the rebound high-firing burst activity at the end of the hyperpolarizing pulse (see also enlargement of the bursting activity in the inset). The graph on the right presents the number of spikes evoked by 1s long depolarizing current injection of increasing amplitudes.

B – Example of activities and single cell RT-PCR products of PV+ APT neurons. Note the expression of the Cav3.2 T- channel in this GAD65 & 67 positive neuron.

C – Application of 100 μ M Ni²⁺, a concentration that antagonizes specifically the Cav3.2 isotype of the T-channels, markedly decreased the number of spikes and increased the minimal inter-spikes intervals (ISI) of the rebound bursts. Typical examples of this pharmacological effect are shown on the right. Note that additional application of 1 μ M TTAP2, a specific antagonist of all T-channel isotypes, further reduced the bursting activity.

D – Same graphs as in C for application of 1 μ M TTAP2

E – Effect of 100 μ M Ni²⁺ (left graph) and 1 μ M TTAP2 (right graph) on the amplitude of the rebound depolarization observed in the presence of TTX. The superimposed traces presented on the right illustrate a typical example of these effects in a given PV+ neuron.

Références

Bourinet E, Francois A, Laffray S (2016) T-type calcium channels in neuropathic pain. *Pain* 157 Suppl 1:S15-22.

Francois A, Schuetter N, Laffray S, Sanguesa J, Pizzoccaro A, Dubel S, Mantilleri A, Nargeot J, Noel J, Wood JN, Moqrich A, Pongs O, Bourinet E (2015) The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell reports*.

Rees H, Roberts MH (1993) The anterior pretectal nucleus: a proposed role in sensory processing. *Pain* 53:121-135.

Résumé

Le contrôle bidirectionnel du couplage neurovasculaire par les neurones pyramidaux

Le couplage neurovasculaire (CNV), le lien étroit entre l'activité neuronale et le flux sanguin cérébral, est essentiel au fonctionnement et à l'intégrité du cerveau. Parmi les acteurs cellulaires du CNV, les neurones pyramidaux exprimant la cyclooxygénase-2 (COX-2) sont responsables d'environ la moitié de la réponse neurovasculaire dilatatrice par la libération de prostaglandine E2 (PGE2). Nous avons cherché à déterminer les régimes d'activité de ces neurones qui déclenchent des réponses neurovasculaires vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et d'en préciser les mécanismes. En utilisant des stimulations optogénétiques sélectives dans des tranches corticales de souris, nous avons montré que les photostimulations à faible fréquence des neurones pyramidaux déclenchent des vasodilatations et des vasoconstrictions à de plus hautes fréquences. Ces photostimulations induisent en fonction de leur fréquence une augmentation graduelle du calcium intracellulaire des neurones pyramidaux. L'analyse par RT-PCR sur cellule unique a révélé que ces neurones expriment les enzymes nécessaires à la synthèse de la PGE2 et de la prostaglandine F2 α (PGF2 α). L'analyse pharmacologique des réponses neurovasculaire montre que les vasoconstrictions sont dépendantes de l'activité neuronale et de la COX-2 et nécessitent l'activation des récepteurs de, EP1 et EP3 de la PGE2 mais pas celui de la PGF2 α . Elles font intervenir le neuropeptide Y (NPY) en agissant sur son récepteur Y1 mais pas des messagers d'origine astrocytaire. L'application de PGE2 induit de façon dose-dépendante à la fois une vasoconstriction et une vasodilatation dans une moindre mesure. Ces résultats indiquent que les neurones pyramidaux et la PGE2 qu'ils produisent jouent un rôle complexe dans le CNV.

Mots clés : [Couplage neurovasculaire ; Neurones pyramidaux ; Prostaglandine E2 ; Artérioles ; Vasoconstrictions ; Optogénétique]

Abstract

Bidirectional control of neurovascular coupling by pyramidal neurons

Neurovascular coupling (NVC), the tight coupling between neuronal activity and cerebral blood flow, is essential for brain function and integrity. Among the cellular actors of NVC, pyramidal neurons expressing cyclooxygenase-2 (COX-2) are responsible for about half of the dilatory neurovascular response through the release of prostaglandin E2 (PGE2). We sought to determine the activity regimes of these neurons that trigger vasodilatory or vasoconstrictor neurovascular responses and to clarify their mechanisms. Using selective optogenetic stimulation in mouse cortical slices, we showed that photostimulations of these neurons trigger vasodilation at low frequency and vasoconstriction at higher frequencies. In addition, these photostimulations induce a gradual frequency-dependent intracellular calcium increase in pyramidal neurons. Single-cell RT-PCR analysis revealed that pyramidal neurons express the enzymes required for the synthesis of PGE2 and prostaglandin F2 α (PGF2 α). Pharmacological analyses show that vasoconstrictions are dependent on neuronal and COX-2 activities and are mediated by the activation of EP1 and EP3 receptors of PGE2 but not that of PGF2 α . They also involve the activation of neuropeptide Y (NPY) Y1 receptors but do not require astrocytic vasoconstrictive messengers. Application of PGE2 induces in a dose-dependent manner both vasoconstriction and vasodilation to a lesser extent. These results indicate that pyramidal neurons and the PGE2 that they produce play a complex role in NVC.

Keywords: [Neurovascular coupling; Pyramidal neurons; Prostaglandin E2; Arterioles; Vasoconstrictions, Optogenetics]