



HAL
open science

Physiopathologie des comas isoélectriques : de l'EEG au neurone

Antoine Carton-Leclercq

► **To cite this version:**

Antoine Carton-Leclercq. Physiopathologie des comas isoélectriques : de l'EEG au neurone. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS744 . tel-04621932

HAL Id: tel-04621932

<https://theses.hal.science/tel-04621932>

Submitted on 24 Jun 2024

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.

THESE DE DOCTORAT SORBONNE UNIVERSITES

Spécialité Neurosciences

Présentée par

Antoine Carton-Leclercq

pour obtenir le grade de

Docteur de Sorbonne Universités

Physiopathologie des comas isoélectriques :

De l'EEG au neurone



Soutenue le 4 Janvier 2022

Pr Régis Lambert	Examineur
Dr Jeanne Paz	Rapporteur
Dr Dominique Debanne	Rapporteur
Pr Lionel Naccache	Examineur
Dr Valérie Crepel	Examineur
Dr Séverine Mahon	Invitée
Pr Stéphane Charpier	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les docteurs Jeanne Paz et Dominique Debanne pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Régis Lambert, Valérie Crepel et Lionel Naccache pour avoir accepté de participer au jury de thèse, c'est un honneur pour moi.

Je tiens à remercier le Pr. Stéphane Charpier qui a su, lors d'un cours de licence 3 en septembre 2016, faire tomber *at vitam eternam* la mâchoire d'un étudiant n'ayant jamais entendu parler des neurosciences sur la table. Plus sérieusement, même le média écrit ne me permet pas d'exprimer toute ma reconnaissance ou de lister tout ce que je te dois. Merci pour ta confiance, ta passion contagieuse, ta tolérance, ton enthousiasme, ton temps, ton attention, ton soutien, ta curiosité, ta sympathie, tes blagues...

Merci à Séverine Mahon, intentionnelle Atlas. Merci pour m'avoir aidé professionnellement et personnellement durant ces années, grâce à toi je suis un meilleur scientifique qu'il y a 4 ans, en tout cas j'espère. Merci d'avoir magnétisé mes amplificateurs lorsqu'en Master, je désespérais. Merci pour ton accompagnement, ton abnégation, tolérance et ta rigueur. Et puis pour les doritos d'anniversaire !

Merci à Manon pour le meilleur piston de ma vie, sans toi, finalement je n'aurais jamais mis les pieds au laboratoire. Merci à toi Wonder Woman, pour ton amitié précieuse et le soutien que tu m'as apporté pendant notre périple académique qui heureusement est loin d'être terminé.

Merci à Paul, mon petit Paul, pour avoir partagé avec moi ces années de thèse. M'avoir beaucoup appris et motivé. Merci pour ton amitié également précieuse. J'ai peu de doutes sur ta réussite et encore moins sur le fait qu'on sera encore longtemps en contact.

Merci à tout le laboratoire passé et présent : Sandrine, Adrien, Stephen, Aurélie, Sarah, Sofia, Mario, Vincent, Valerio, Virginie, Mark, Jimena, Anthony, Alice.

Merci à tous mes amis en dehors de l'équipe : Grace, Tomek, Marina, Nicolas, Rémi, Lindsay, Alex, Delphine.

Merci aux bruxellois, merci aux lillois, merci aux marseillais (le pays des oiseaux secs), merci aux berlinois.

Merci au groupe « The Babels » et aux Beastie Boys.

Merci à l'incongru, Nounou, Tritri, Tutur, Josianne Tabasco et tous les amis du château.

*« Shhhh Shhhh
It's Oh so quiet*

*Shhhh Shhhh
It's Oh so still »*

Björk, Post, 1995

Table des matières

Résumé	12
Summary	13
1 Introduction	14
1.1 Le cerveau spontanément actif	14
1.1.1 L'électroencéphalogramme	14
1.1.1.1 <i>Historique</i>	14
1.1.1.2 <i>Bases neuronales des activités EEG</i>	15
1.1.1.2.1 Les neurones du cortex cérébral	15
1.1.1.2.2 Considérations méthodologiques	15
1.1.1.2.3 Electrogénèse de l'activité EEG	17
1.1.2 Les différents rythmes physiologiques	18
1.1.2.1 <i>Les rythmes de l'éveil</i>	20
1.1.2.1.1 Le rythme Alpha.....	20
1.1.2.1.2 Le rythme Thêta	21
1.1.2.1.3 Les rythmes Béta-Gamma	23
1.1.2.2 <i>Les rythmes du sommeil</i>	26
1.1.2.2.1 Les fuseaux de sommeil	26
1.1.2.2.2 Les ondes delta	28
1.1.2.2.3 Les ondes lentes	29
1.1.2.3 <i>Impact des activités corticales spontanées sur l'excitabilité neuronale</i>	31
1.1.2.4 <i>Autres potentiels cérébraux</i>	33
1.1.2.4.1 Les rythmes ultra-lents	34
1.1.2.4.2 Le potentiel DC	35
1.2 Les activités cérébrales altérées	37
1.2.1 Les activités induites par les anesthésiques	37
1.2.1.1 <i>Les molécules anesthésiques</i>	37
1.2.1.1.1 Les agonistes GABAergiques	37
1.2.1.1.2 Les agonistes des récepteurs opioïdes	37
1.2.1.1.3 Les substances dissociatives.....	38
1.2.1.2 <i>Patrons EEG et activités intracellulaires induits par les anesthésiques</i>	38
1.2.2 Les comas	40
1.2.2.1 <i>Définition et étiologies</i>	40
1.2.2.2 <i>Généralisation d'activités oscillatoires</i>	41
1.2.2.2.1 Les comas à ondes delta	41
1.2.2.2.2 Les comas à ondes alpha	42
1.2.2.3 <i>Activités EEG déstructurées</i>	42
1.2.2.3.1 Les activités périodiques	42
1.2.2.3.2 Le profil EEG de type « Burst-Suppression »	43
1.3 Les états isoélectriques	46
1.3.1 Définitions cliniques et neurophysiologiques	46

1.3.2	L'état isoélectrique induit par les barbituriques	47
1.3.2.1	<i>Mécanismes d'action des barbituriques : aspects cellulaires et dose-dépendance</i> ...	47
1.3.2.2	<i>Mécanismes d'induction de l'état isoélectrique</i>	48
1.3.2.3	<i>Impact sur l'excitabilité cellulaire et l'intégration sensorielle</i>	49
1.3.3	L'état isoélectrique induit par les éthers halogénés	51
1.3.3.1	<i>Les différents composés</i>	51
1.3.3.2	<i>Mécanismes d'action des éthers halogénés : aspects cellulaires et dose-dépendance</i>	52
1.3.3.2.1	<i>Actions présynaptiques des éthers halogénés</i>	52
1.3.3.2.2	<i>Actions postsynaptiques des éthers halogénés</i>	53
1.3.3.2.3	<i>Actions des éthers halogénés au niveau du soma</i>	55
1.3.3.3	<i>Mécanismes de l'induction de l'état isoélectrique par les éthers halogénés</i>	56
1.3.4	L'hypothermie	58
1.3.4.1	<i>Mécanismes d'action de l'hypothermie : aspects cellulaires</i>	59
1.3.4.2	<i>Implications sur l'excitabilité cellulaire et l'intégration sensorielle</i>	60
1.3.4.3	<i>Mécanismes d'induction de l'état isoélectrique</i>	61
1.3.4.4	<i>Hypothermie et neuroprotection</i>	62
1.3.5	L'anoxie cérébrale	62
1.3.5.1	<i>Oxygène et métabolisme neuronal</i>	62
1.3.5.2	<i>Effets de l'anoxie sur l'activité spontanée des neurones</i>	64
1.3.5.2.1	<i>Modifications post-anoxiques précoces</i>	64
1.3.5.2.2	<i>Etat isoélectrique</i>	67
1.3.5.3	<i>La dépolarisation anoxique</i>	68
1.3.5.3.1	<i>Mécanismes</i>	70
1.3.5.3.2	<i>Initiation et propagation de l'AD</i>	71
1.3.5.3.3	<i>Conséquences structurelles</i>	73
1.3.5.4	<i>Conséquences cliniques</i>	74
1.4	Buts spécifiques et approches expérimentales	75
1.4.1	De nouvelles questions	75
1.4.2	...et leurs stratégies d'étude	76
1.4.2.1	<i>Etude 1</i>	76
1.4.2.2	<i>Etude 2</i>	76
1.4.2.3	<i>Etude 3</i>	77
2	Résultats	78
2.1	Article 1: Neuronal excitability and sensory responsiveness in the thalamo-cortical pathway in a novel rat model of isoelectric brain state	78
2.1.1	Rappel du contexte de la recherche	78
2.1.2	Matériel et Méthodes	80
2.1.2.1	<i>Préparation des animaux et chirurgie</i>	80
2.1.2.2	<i>Délinéation des états cérébraux successifs</i>	80
2.1.2.3	<i>Enregistrements électrophysiologiques multi-échelles</i>	81
2.1.2.4	<i>Stimulations sensorielles</i>	81

2.1.2.5	<i>Analyse des signaux intracellulaires</i>	82
2.1.2.6	<i>Analyse des signaux ECoG et extracellulaires</i>	83
2.1.2.7	<i>Analyse statistique</i>	84
2.1.2.8	<i>Marquage des neurones</i>	84
2.1.3	Principaux résultats	84
2.2	Article 2: Identifying the neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia	107
2.2.1	Rappel du contexte de la recherche	107
2.2.2	Matériel et Méthodes	107
2.2.2.1	<i>Préparation des animaux et chirurgie</i>	107
2.2.2.2	<i>Enregistrements électrophysiologiques multi-échelles</i>	107
2.2.2.3	<i>Procédure d'asphyxie, de récupération et segmentation des différents états</i>	108
2.2.3	Principaux résultats	108
2.3	Article 3: Anoxic depolarization is preferentially initiated in deep layers of primary somatosensory in a rodent model of global reversible anoxia <i>in vivo</i>	122
2.3.1	Rappel sur le contexte de la recherche	122
3	Discussion	144
3.1	Avant-propos	144
3.2	Les états isoélectriques pharmacologiques	144
3.2.1	<i>Induction de l'état isoélectrique par les éthers halogénés</i>	145
3.2.2	<i>Impact de l'état isoélectrique sur l'excitabilité intrinsèque des neurones et l'intégration sensorielle</i>	147
3.3	L'anoxie cérébrale : de complexes transitions d'états	149
3.3.1	<i>Pertinence et limites de nos modèles anoxiques</i>	150
3.3.2	<i>Réversibilité de l'AD : l'Onde de la Réanimation</i>	152
3.3.3	<i>Sensibilité neuronale différentielle à l'anoxie</i>	153
3.3.4	<i>Les corrélats neuronaux des expériences de mort imminente ?</i>	155
3.4	Diversité des états isoélectriques	157
3.4.1	<i>Conséquences cliniques et fonctionnelles des états isoélectriques pharmacologiques</i>	157
3.4.2	<i>A la recherche de biomarqueurs de la mort et de la réanimation</i>	158
3.4.3	<i>Un canal pour les inhiber tous et dans le silence les lier</i>	159

Liste des figures

Figure 1 : Enregistrement des signaux électrophysiologiques.....	17
Figure 2 : Les rythmes cérébraux des différents états de vigilance.....	19
Figure 3 : Le rythme alpha et sa genèse corticale.	21
Figure 4 : Interaction spatiotemporelle entre les cellules pyramidales et différentes classes d'interneurones du CA1..	22
Figure 5 : Génération des rythmes Béta-Gamma.	24
Figure 6 : Emergence et synchronisation des fuseaux du sommeil au sein de la boucle thalamo-corticale.	27
Figure 7 : Les ondes delta du sommeil profond et leur émergence des propriétés intrinsèques des neurones thalamiques.	28
Figure 8 : Effet de la déafférentation corticale sur la cohérence spatiotemporelle des ondes lentes. ..	29
Figure 9 : Alternance d'états « haut » et « bas » durant le sommeil à ondes lentes et son interruption par la transmission cholinergique du noyau pédonculopontin (PPT).....	30
Figure 10 : Modulation stimulus-dépendante de la relation entrée-sortie chez le chat anesthésié au thiopental <i>in vivo</i>	33
Figure 11 : Les ondes ultra-lentes durant les différents états de vigilance.....	34
Figure 12 : Génération de DC shifts à l'EEG par conduction volumique depuis la barrière hématoencéphalique.	36
Figure 13 : Les molécules anesthésiques induisent des patrons d'activité synaptique spécifiques.. ...	39
Figure 14 : Généralisation d'activités oscillatoire lors des états de coma.....	41
Figure 15 : Déstructuration des activités EEG lors des comas.....	43
Figure 16 : Le patron B-S et ses différentes étiologies..	44
Figure 17 : Les barbituriques potentialisent la transmission synaptique GABAergique.	47
Figure 18 : L'impact de l'induction d'un état isoélectrique par les barbituriques sur les propriétés d'excitabilité et d'intégration sensorielle des neurones corticaux.	50
Figure 19 : Les effets présynaptiques des éthers halogénés.	53
Figure 20 : Effet des éthers halogénés sur les récepteurs glutamatergiques.	54
Figure 21 : Effets des éthers halogénés sur les canaux voltage-dépendants.	55
Figure 22 : Induction d'un état isoélectrique par les éthers halogénés.....	57
Figure 23 : Effets de la température sur les propriétés de passives de membrane et le potentiel d'action.....	60
Figure 24 : Le métabolisme d'activation dans les neurones.	63
Figure 25 : Effets de l'anoxie sur la dynamique des activités synaptiques.	66
Figure 26 : La Terminal Spreading Depolarization ou Onde de la Mort..	69
Figure 27 : La dépolarisation anoxique vue du milieu extracellulaire.	71
Figure 28 : Propagation de l'AD induite par injection locale de KCl.	72
Figure 29 : Conséquences de l'AD sur la morphologie cellulaire.....	74

Liste d'abréviations

[Ca²⁺]_i : concentration intracellulaire en calcium

[K⁺]_e : concentration extracellulaire en potassium

AD : dépolarisation anoxique

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionate

ATP: adenosine triphosphate

BIILED : décharges épileptiformes périodiques bilatérales

B-S: burst-suppression

CA1 : première aire de la corne d'Ammon

DC : courant direct

DSC : débit sanguin cérébral

ECoG : électrocorticogramme

EEG : électroencéphalogramme

EMI : expérience de mort imminente

GABA_A : récepteur au GABA de type A

I_H : courant cationique non sélectif activé par l'hyperpolarisation

I_{NaP}: courant sodique persistant

I_T : courant calcique à bas seuil

K_{ATP} : courant potassique sensible à la concentration d'ATP intracellulaire

KCl : chlorure de potassium

LFP : potentiel de champ local

MAC : concentration alvéolaire minimale d'agent anesthésique volatile nécessaire à l'abolition des réflexes à des stimulations douloureuses

Na/K-p : pompe sodium-potassium ATP-dépendante

Na_v : Canal sodique voltage-dépendant

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nRT : noyau réticulaire du thalamus

O₂: dioxygène

OdM : onde de la mort

OdR : onde de la réanimation

PA: potentiel d'action

PLED : décharge épileptiforme périodique latéralisée

PLIDD : décharge triphasique diffuse à longue période

PSIDD : décharge triphasique diffuse à courte période

S1BF: cortex à tonneaux

TSD: terminal spreading depression

TTX : tétrodoxtine

VPm: noyau ventro-postérieur médian du thalamus

Résumé

Le cerveau génère de façon continue et endogène des activités électriques qui peuvent être enregistrées en surface grâce à un électroencéphalogramme (EEG). La fréquence et l'amplitude de ces potentiels EEG varient selon l'état de vigilance. Ainsi, l'état d'éveil conscient se caractérise par des activités rapides (≥ 10 Hz) et de faible amplitude, alors que le sommeil profond est associé à des oscillations amples et de basse fréquence (≈ 1 Hz). L'EEG est donc un outil clinique permettant d'établir des corrélations entre le patron global d'activité cérébrale et l'état physiologique ou pathologique du sujet. Lors d'une atteinte cérébrale d'origine traumatique, métabolique ou anoxique conduisant à un coma, les patrons EEG sont altérés et surviennent des profils EEG anormaux, tels que la généralisation et la persistance d'activités oscillatoires ou d'un patron d'activité de type *burst-suppression* (B-S), alternant bouffées de potentiels de grande amplitude et périodes de silence électrique.

Le profil EEG le plus péjoratif, et le moins connu d'un point de vue neurophysiologique, est celui privé d'activité, aussi appelé *isoélectrique*. Un EEG isoélectrique est le plus souvent définitif lorsqu'il survient après un violent traumatisme crânien, une encéphalopathie ischémique ou une anoxie cérébrale prolongée, mais peut être réversible en cas d'intoxication médicamenteuse, d'hypothermie ou après une réanimation réussie. Il est généralement admis qu'une suspension des activités EEG spontanées reflète un arrêt complet des fonctions neuronales, rendant le cerveau incapable de traiter des informations endogènes ou exogènes. Mes recherches doctorales ont eu pour but d'explorer les propriétés fonctionnelles des neurones et réseaux corticaux qui pourraient possiblement persister lors d'un coma isoélectrique.

J'ai dans un premier temps mis au point un nouveau modèle rongeur d'état isoélectrique réversible induit par l'administration de fortes doses d'isoflurane, un anesthésique volatil central de la famille des éthers halogénés. À l'aide d'enregistrements EEG et intracellulaires *in vivo*, j'ai comparé l'excitabilité intrinsèque et les réponses sensorielles, issues de la déflexion des vibrisses, des neurones corticaux somatosensoriels pendant une période d'activité EEG continue et après suppression des activités cérébrales. J'ai montré que dans l'état isoélectrique les neurones corticaux étaient hyperpolarisés, dépourvus de potentiels synaptiques et de décharge spontanée, mais qu'ils conservaient leur capacité à être excités et à répondre à des stimulations sensorielles.

J'ai ensuite réalisé des enregistrements multi-échelle dans un second modèle rongeur de coma isoélectrique induit par une anoxie cérébrale. J'ai montré que l'asphyxie chez le rat curarisé provoquait une rapide atténuation des activités neuronales dans toutes les couches du cortex jusqu'à l'obtention de tracés isoélectriques. Le silence électro-cérébral n'étant interrompu que par l'émergence dans les couches profondes d'une onde triphasique se propageant bidirectionnellement à toutes les couches du cortex. Cette onde baptisée *onde de la mort* (OdM) était le reflet extracellulaire d'une dépolarisation anoxique des neurones corticaux au terme de laquelle toute excitabilité intrinsèque était abolie. La ré-oxygénation déclenchait une repolarisation des neurones, coïncidant à son tour avec une autre onde corticale, *l'onde de la réanimation* (OdR). Après l'OdR, les activités neuronales et EEG récupéraient progressivement leurs niveaux pré-anoxiques.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence qu'un arrêt complet des activités cérébrales endogènes conduisant à un EEG plat ne signifie pas forcément un arrêt des fonctions neuronales et qu'un même profil EEG peut refléter différents états fonctionnels des réseaux neuronaux.

Summary

The brain continuously generates electrical activities. Once recorded at the surface of the brain they constitute an electroencephalogram (EEG). The bidirectional fluctuations displayed on an EEG trace come from the summation of numerous excitatory and inhibitory synaptic events occurring in cortical neurons. Both frequency and shape of EEG fluctuations may change in accordance with the subject's various internal states. Thus, the active wake is characterized by fast (≥ 10 Hz), low amplitude oscillations whereas the slow-wave sleep EEG pattern displays large and low frequency (≈ 1 Hz) oscillations. The EEG is therefore used in clinical settings to establish correlations between the background electrical activity of the brain and the subject's physiological state. After traumatic, metabolic or anoxic brain insults leading to a coma, EEG patterns are altered giving rise to abnormal EEG patterns such as generalized and persistent oscillations or "Burst-Suppression" (B-S) alternating large electrical potentials and periods of electro-cerebral silence.

The most pejorative EEG pattern, and the least understood from a neurophysiological standpoint, is deprived of activity and called the "isoelectric" brain state. An isoelectric EEG is most often irreversible when it follows a violent head trauma, ischemic encephalopathy or prolonged brain anoxia but can be reversed when caused by drug intoxication, deep hypothermia or after a successful resuscitation. It is commonly assumed that the shutting down of spontaneous background activity leads to the abolition of neuronal functions leading to cerebral unresponsiveness to whether endogenous or peripheral stimuli. My doctoral work focuses on the exploration of neurons and networks' functional properties that might potentially subsist during the isoelectric coma.

Firstly, I designed a novel rodent model of reversible isoelectric brain state induced by administration of large doses of isoflurane, a volatile anesthetic halogenated ether. By performing EEG and *in vivo* intracellular recordings I compared cortical neurons' intrinsic excitability and whisker evoked sensory responses between an active EEG period and after the abolition of ongoing background activities. I showed that during the isoelectric brain state, cortical neurons were hyperpolarized, deprived of synaptic potentials and spontaneous discharge activity but were still excitable and responsive to peripheral stimuli.

I then performed multi-scale electrophysiological recordings in a second rodent model of isoelectric coma, induced by brain anoxia. I showed that asphyxia in curarized rats lead to a quick dampening of neuronal activity in all cortical layers. Activity then shuts down giving rise to a continuous isoelectric line, the electro-cerebral silence is then disrupted by the emergence in deep cortical layers of a large amplitude triphasic wave that then propagated bidirectionally to the other layers of the cortex. This wave called the wave of death (WoD) was the extracellular reflection of an anoxic depolarization in cortical neurons during which intrinsic excitability is abolished. The quick re-oxygenation of the brain led to a repolarization of neurons that was correlated with the appearance on the surface of another wave, the wave of resuscitation (WoR). After the WoR, neuronal and extracellular activities regained their normoxic values.

My work allowed me to highlight that a total cessation of endogenous cerebral activities leading to a flat-line EEG isn't necessarily synonymous of an abolition of neuronal functions and that the same EEG profile can be the reflection of different functional states of neuronal networks.

1 Introduction

1.1 Le cerveau spontanément actif

1.1.1 L'électroencéphalogramme

1.1.1.1 Historique

Au mois d'août 1875 lors de la réunion annuelle de la *British Medical Association* à Edimbourg que Richard Caton, un jeune médecin de Liverpool, présenta pour la première fois les résultats des expériences qu'il avait pratiqué sur des cerveaux de lapins et de singes. Il expliqua qu'après avoir placé les aiguilles d'un galvanomètre de Thomson à la surface du cerveau dénudé ainsi que sur le crâne des animaux, il observa de « faibles courants de direction variables passant au travers du galvanomètre » (Caton, 1875; Geddes, 1987). Caton alla même plus loin : « les courants électriques du cerveau semblent être en relation avec sa fonction ». Cette affirmation faisant suite à l'observation de courants négatifs dans les aires motrices lors de la rotation de la tête ou de la mastication (Caton, 1875). Peu de temps après la découverte de Caton, un physiologiste polonais du nom d'Adolf Beck publia dans le *Centralblatt für Physiologie* des résultats obtenus sur des grenouilles, chiens et lapins. Dans son article, Beck décrit l'apparition de courants négatifs à la surface du cortex en réponse à des stimulations sensorielles de différentes modalités, confirmant ainsi le lien entre fonction cérébrale et activité électrique énoncé par Caton (Beck, 1890; Coenen et Zayachkivska, 2013). Cependant, Beck relève qu'il enregistre des courants électriques spontanés dans les deux directions collectés en l'absence de stimulations électriques ou périphériques, ceux-ci n'étant pas corrélés aux rythmes cardiaques ou respiratoires (Coenen et Zayachkivska, 2013). En 1929 ces courants électriques spontanés seront enregistrés à la surface des crânes intacts des deux enfants de Hans Berger. Disposant de galvanomètres plus sensibles et d'amplificateurs plus puissants qu'au siècle précédent, Berger met pour la première fois en évidence la présence de courants électriques cérébraux spontanés chez l'humain (Berger, 1929). Cette nouvelle technique non-invasive baptisée *Elektrenkephalogram* permit à Berger de montrer que le rythme oscillatoire de ces activités cérébrales spontanées chez l'homme variait au gré des différents états de vigilance. Il fut ainsi le premier à décrire le rythme alpha, « le rythme Berger », qui prédomine au niveau des lobes occipitaux de sujets au repos les yeux fermés (Berger, 1931). L'électroencéphalogramme (EEG) est utilisé comme outil d'investigation neurophysiologique

permettant d'identifier les différents états de vigilance (éveil, sommeil lent, sommeil paradoxal) et les activités liées aux processus d'attention ou à la réalisation d'une tâche. Il est également un outil diagnostique indispensable pour l'évaluation de certaines pathologies cérébrales comme le coma ou l'épilepsie.

1.1.1.2 Bases neuronales des activités EEG

1.1.1.2.1 Les neurones du cortex cérébral

Les ondes collectées par l'EEG à la surface du cerveau sont la résultante de la sommation des courants électriques générés par plusieurs de milliers de neurones (Fig 1A; Speckmann et coll., 2011). Dans le cortex cérébral on dénombre deux types neuronaux principaux : les neurones pyramidaux, le type neuronal majoritaire du cortex cérébral (80%) et les interneurones (20%) libérant de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur (Harris et Mrsic-Flogel, 2013). Au niveau intracellulaire, l'activité corticale de fond se manifeste par des fluctuations du potentiel transmembranaire résultant d'un mélange d'activités synaptiques excitatrices et inhibitrices, celles-ci découlant de l'activité de décharge spontanée des neurones afférents (Destexhe et coll., 2003). L'activité synaptique de fond dans le cortex cérébral est particulièrement intense, ceci est dû en partie à sa connectivité extrêmement dense (Binzegger et coll., 2004). Chaque neurone pyramidal reçoit entre 5000 et 60 000 entrées synaptiques dont la majeure partie provient du réseau local via des collatérales récurrentes (Fig 1A; Binzegger et coll., 2004; DeFelipe et Fariñas, 1992; Harris et Mrsic-Flogel, 2013) bien que certaines entrées synaptiques sont reçues de structures sous-corticales telles que le thalamus (Constantinople et Bruno, 2013; Meyer et coll., 2010) ou le tronc cérébral (Lee et Dan, 2012) et peuvent jouer un rôle important dans l'établissement ou le maintien de différents états cérébraux (Gent et coll., 2018; Poulet et coll., 2012).

1.1.1.2.2 Considérations méthodologiques

Dans le système nerveux central, une pléthore de neurones génèrent et transmettent en continu des signaux électrophysiologiques afin de communiquer entre cellules et régions cérébrales. Depuis les premiers galvanomètres, les efforts des neurosciences se sont concentrés sur l'établissement de méthodes permettant d'enregistrer l'activité des neurones et réseaux afin d'établir des relations voulues causales entre leur activité et la physiologie cérébrale. Pour comprendre le fonctionnement du cerveau, il est nécessaire de comprendre celui de son unité constitutive. Des techniques comme le patch-clamp ou l'enregistrement intracellulaire

« sharp » permettent de recueillir, à la microseconde près, les variations de potentiel électrique au sein des cellules voire des canaux unitaires, dans le cas du patch-clamp, dans des préparations *in vitro* ou des cerveaux intacts (Fig. 1B; Verkhratsky et coll., 2006). Ces techniques sont cependant limitées dans la nature des informations qu'elles nous apportent sur le fonctionnement du cerveau. D'une part les enregistrements intracellulaires nous renseignent sur des événements dont la durée va de la milliseconde à quelques heures et d'une autre, par le biais de ces méthodes, le fonctionnement des réseaux dans lesquels les cellules enregistrées se situent ne peut être qu'inféré. Pour étudier des phénomènes neurophysiologiques impliquant des dynamiques complexes de réseaux et/ou ayant lieu à moyen ou long terme il est crucial de coupler les enregistrements intracellulaires à des méthodes disposant d'une résolution spatiotemporelle complémentaire.

L'activité conjointe des neurones provoque, dans le milieu interstitiel, des fluctuations de potentiel électrique pouvant être recueillies par différentes méthodes d'enregistrement extracellulaire aux résolutions spatiales variées (Fig 1A, B; Buzsáki et coll., 2012). Ces dernières années ont vu un développement exponentiel des technologies de suivi neurophysiologique des réseaux neuronaux (Hong et Lieber, 2019). Les électrodes extracellulaires permettent de suivre, en plusieurs endroits et pour des durées allant jusqu'à la semaine, les variations de potentiel extracellulaire ou potentiel de champ local (LFP) de volumes restreints et, par la manipulation de filtres, d'en extraire l'activité de décharge des neurones avoisinant (Fig. 1A, B; Buzsáki, 2004; Buzsáki et coll., 2012). L'EEG, quant à lui, permet l'enregistrement, pendant des durées pouvant aller jusqu'à des semaines, des potentiels électriques d'aires bien plus vastes ($\sim 10 \text{ cm}^2$) sur la totalité du cortex (Fig. 1B). De manière réciproque, les méthodes d'enregistrement extracellulaires ne permettent pas de nous renseigner sur l'état physiologique, en particulier de l'excitabilité intrinsèque, des neurones du réseau enregistré.

Loin d'être antagonistes, ces approches se complètent et la mise en relation des signaux intra et extracellulaires nous permettent d'établir des corrélations sur le rôle joué par les propriétés électrophysiologiques des neurones dans l'activité de fond des réseaux.

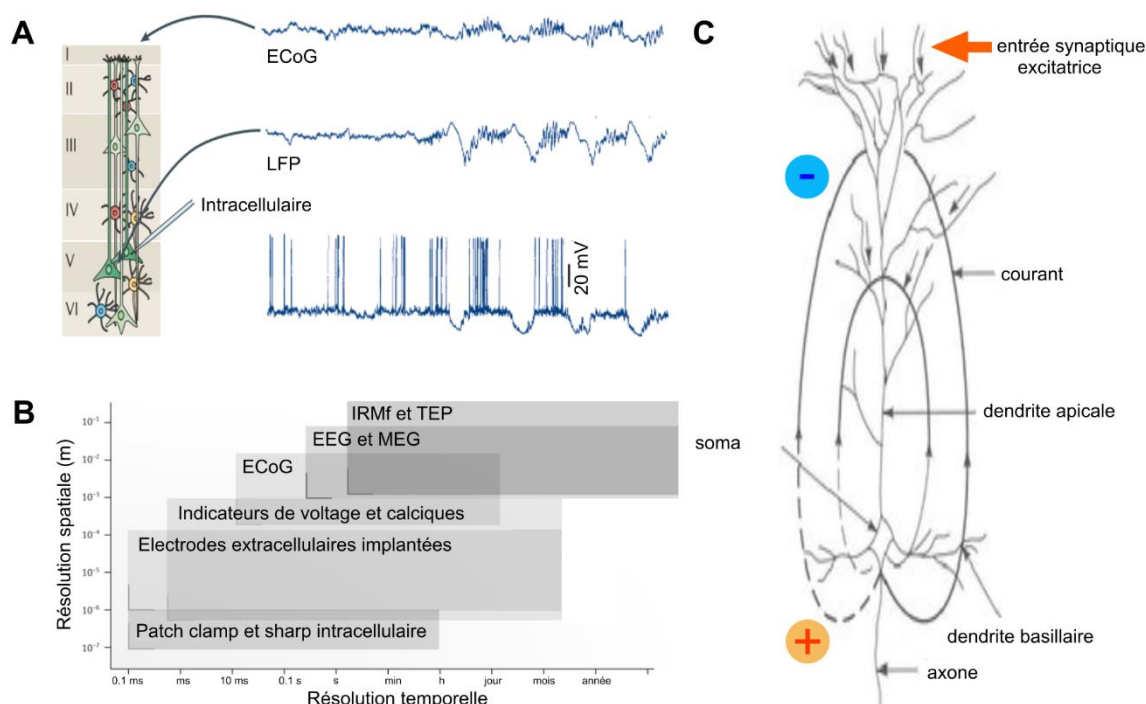


Figure 1 : Enregistrement des signaux électrophysiologiques. **A**, Enregistrement simultané des potentiels électrocoérogaphiques (ECoG), de la couche 5 du cortex (LFP) et de l'activité intracellulaire d'une cellule pyramidale de la couche 5 du cortex chez le chat anesthésié à la kétamine-xylazine. Noter le changement de polarité des signaux intracellulaires et extracellulaires ainsi que l'atténuation des fluctuations LFP dans les signaux ECoG. **B**, Les contraintes spatiotemporelles de la plupart des techniques d'enregistrement électrophysiologique. La longueur et la largeur des rectangles représentent la gamme spatiotemporelle de stabilité d'enregistrement. MEG : magnétoencéphalographie. IRMf : Imagerie à résonance magnétique fonctionnelle. TEP : Tomographie à émission de positrons. **C**, Electrogénèse des potentiels EEG de surface évoqués par la transmission synaptique excitatrice au niveau de la dendrite apicale. Les flèches représentent le sens du flux de courant. A, d'après Buzsáki et coll., 2012 ; B, d'après Hong et Lieber, 2019 ; C, modifié d'après Neuman, 2010.

1.1.1.2.3 Electrogénèse de l'activité EEG

Les courants électriques enregistrés à la surface du cerveau ou par des électrodes sous-durales sont issus de la sommation des courants synaptiques, des potentiels d'actions (PAs) ou encore des courants intrinsèques. En conditions physiologiques, on suppose que les flux ioniques extracellulaires sont en majeure partie issus des courants générés au niveau synaptique (Buzsáki et coll., 2012; Speckmann et coll., 2011). Au niveau de la synapse, la libération de neurotransmetteurs excitateurs par l'élément pré-synaptique entraîne une ouverture de canaux ioniques associés aux récepteurs transmembranaires de l'élément post-synaptique. Celle-ci génère une entrée de cations dans le milieu intracellulaire, dépolarisant le potentiel membranaire tout en créant un déficit extracellulaire local de charges positives. Des flux cationiques de sens opposés sont alors créés de chaque part de la membrane cellulaire générant

une boucle de courant, un dipôle, dont les potentiels électriques sont enregistrables dans le milieu extracellulaire (Fig. 1C; Speckmann et coll., 2011). De manière réciproque les flux anioniques (impliquant principalement les ions chlore) traversant la membrane au niveau de la synapse créent un déficit de charges négatives local dans le milieu interstitiel et un gradient de potentiel le long de la membrane neuronale (Speckmann et coll., 2011). Les courants synaptiques inhibiteurs ne contribuent, en théorie, qu'à une faible partie des potentiels de champ car ils mettent en jeu majoritairement le chlore dont le potentiel d'équilibre est proche du potentiel membranaire de repos (-70 mV). Cela dit dans des conditions physiologiques d'activité soutenue le potentiel membranaire des neurones corticaux est très dépolarisé (-60 mV), la transmission inhibitrice peut générer des courants transmembranaires non négligeables (Buzsáki et coll., 2012).

Cette transmission synaptique, en particulier celle faite au niveau des cellules pyramidales du cortex, est la cause principale des fluctuations de potentiel enregistrées à l'EEG. Elles possèdent de longues et épaisses dendrites apicales favorisant la genèse de dipôles le long de leur axe somato-dendritique. De plus, au sein du cortex les dendrites apicales des cellules pyramidales sont à la fois parallèles entre-elles et perpendiculaires à la surface permettant une sommation efficace des dipôles actifs et ce, malgré l'atténuation effective des courants électriques par les méninges, le crâne et la peau (Buzsáki et coll., 2012; Geisler et Gerstein, 1961). L'EEG recueille la sommation des potentiels de champs en surface, donc l'enregistrement d'une déflexion de potentiel EEG « positive » ne permet pas forcément de conclure sur la nature excitatrice ou inhibitrice des activités synaptiques sous-jacentes. La polarité du potentiel EEG dépend de la position des activités synaptiques à l'origine du potentiel de champs par rapport à l'électrode (Fig. 1A; Buzsáki et coll., 2012; Speckmann et coll., 2012). S'ajoutant à l'intensité, au signe (positif ou négatif) et à la position relative de chaque courant transmembranaire, leur coordination temporelle (i.e. leur synchronie) est positivement corrélée à l'amplitude des potentiels de champs enregistrés à l'EEG (Buzsáki et coll., 2012).

1.1.2 Les différents rythmes physiologiques

Grâce à l'analyse du contenu spectral des signaux EEG, on peut mettre en évidence des activités oscillatoires (des rythmes) qui sont le reflet du fonctionnement synchrone des réseaux neuronaux (Singer, 1993). Les rythmes sont classifiés en fonction de la fréquence de leurs oscillations (Fig. 2B; Penttonen et Buzsáki, 2003). L'amplitude de celles-ci est négativement

corrélée à leur fréquence (Buzsáki et Draguhn, 2004) car les assemblées de neurones dont l'activité est synchronisée à de hautes fréquences sont composées d'une plus petite quantité de neurones que celles oscillant à des fréquences plus basses (Singer, 1993). Les fluctuations de potentiel EEG spontanées sont issues de l'activité des réseaux neuronaux et définissent les états cérébraux. Celles-ci varient en amplitude et en fréquence selon les différents états de vigilance (de l'éveil conscient au sommeil profond) (Fig. 2A). Bien que les états cérébraux soient coalescents (Harris et Thiele, 2011), une classification des activités spontanées est possible en corrélant les différents rythmes générés et l'état de vigilance dans lequel ils sont enregistrés (Fig. 2C).

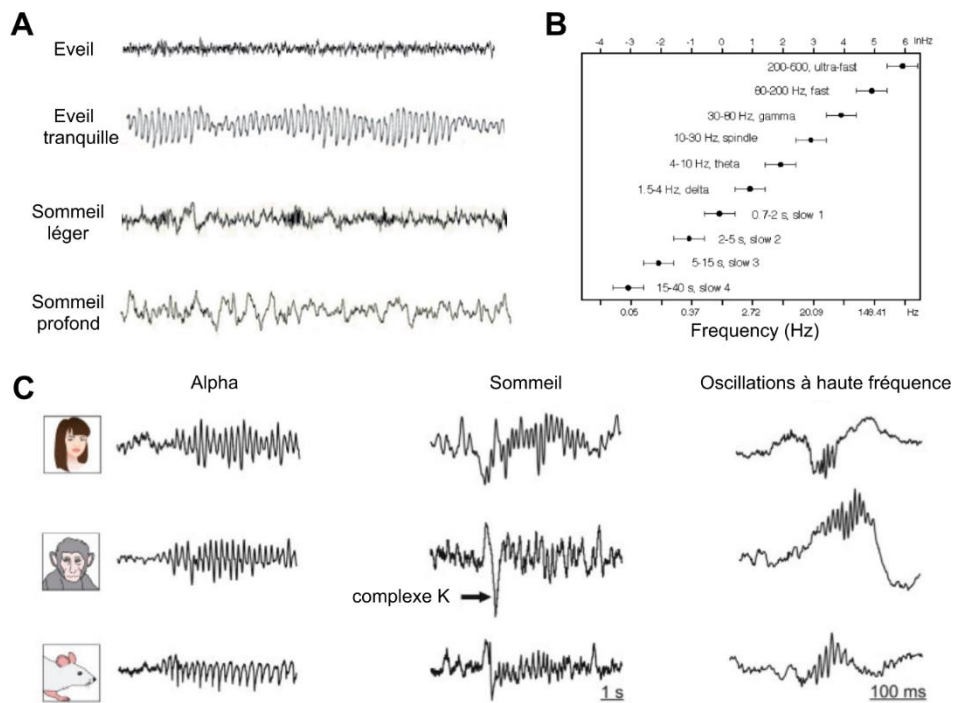


Figure 2 : Les rythmes cérébraux des différents états de vigilance. A, Tracés EEG enregistrés chez l'homme durant différents états d'éveil. Noter les différents rythmes ; l'aspect « désynchronisé » typique de l'EEG d'éveil, le rythme alpha lors de l'éveil tranquille, les fuseaux de sommeil pendant le sommeil léger, l'activité delta du sommeil profond. B, Les différentes classes d'oscillations enregistrées à l'EEG représentées sur une échelle logarithmique. C, Traces illustratives d'activité alpha, de fuseaux de sommeil et d'oscillations à haute fréquence dans différentes espèces de mammifères. La flèche indique un complexe K précédant le fuseau. Noter la similarité de fréquence, dynamique et forme des oscillations dans les différentes espèces. A, d'après Brown et coll., 2010 ; B, d'après Penttonen et Buzsáki, 2003 ; C, modifié d'après Buzsáki et coll., 2013.

1.1.2.1 Les rythmes de l'éveil

L'éveil, enregistré par l'EEG, se caractérise par de rapides fluctuations de potentiels électriques de basse amplitude (Fig. 2A; Destexhe et coll., 1999). Le manque de cohérence spatio-temporelle entre aires corticales distantes dans l'activité électrique de fond a amené à la qualifier de désynchronisée (Destexhe et coll., 2007). Le patron d'activité caractéristique de l'éveil a aussi été appelé état « activé » car il peut être induit par l'activation du système réticulaire du tronc cérébral (Lee et Dan, 2012). Malgré son aspect désynchronisé, il est toutefois possible d'extraire de l'activité électrique d'éveil des activités oscillatoires de fréquences variées (Fig. 2B) elles-mêmes associées à des patrons d'activité intracellulaires spécifiques.

1.1.2.1.1 *Le rythme Alpha*

La description initiale du rythme alpha a aussi marqué les débuts de l'électroencéphalographie (Berger, 1931). Le rythme alpha est une oscillation ample comprise entre 8 et 13 Hz (Fig. 2B, 3A) originalement enregistrée dans les aires occipitales lors de l'éveil calme chez un individu qui ferme les yeux (Fig. 2A, C). Des oscillations dans la bande de fréquence alpha peuvent être aussi enregistrées au niveau des aires somesthésiques et des lobes temporaux, elles prennent alors respectivement les noms de rythme Mu et Tau (Chang et coll., 2012).

Dans le cortex visuel du chien et du primate les oscillations à la fréquence alpha sont générées au niveau des corps cellulaires et dendrites basales des neurones des couches 5 et 6 du cortex (Fig. 3B). La cohérence limitée entre les oscillations enregistrées dans le cortex et celles recueillies au niveau de certains noyaux thalamiques comme le noyau géniculé latéral et le pulvinar amène à conclure que la propagation des ondes alpha dans le cortex est principalement issue de l'activité des connexions intracorticales (Fig. 3B; Bollimunta et coll., 2008; Lopes Da Silva et Storm Van Leeuwen, 1977; Lopes da Silva et coll., 1980). De plus, une étude réalisée *in vitro* chez le rat a révélé que l'émergence des ondes alpha dans le cortex somatosensoriel primaire était dépendante de l'activité des récepteurs à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) et que le blocage des récepteurs GABAergiques de type A (GABA_A) par la bicuculline entraînait un maintien des oscillations du réseau local dans les fréquences de la bande alpha (Flint et Connors, 1996).

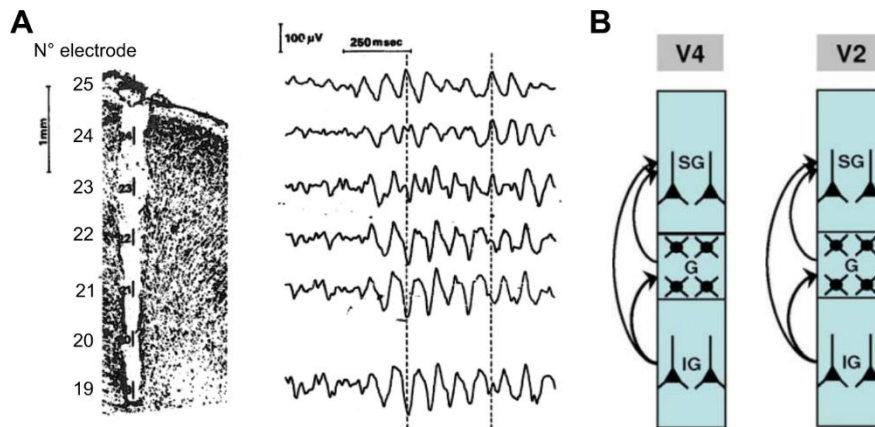


Figure 3 : Le rythme alpha et sa genèse corticale. **A, Gauche :** Photomicrographie d'une tranche de gyrus marginal de chien. Noter la trace des électrodes observable dans le tissu. Droite : Exemple de période d'activité alpha enregistré par les électrodes indiquées dans le panneau de gauche. Noter le changement de polarité entre les électrodes superficielles (25,24) et profondes (19). **B,** Représentation schématique de la génération du rythme alpha dans les aires visuelles. Les flèches représentent les interactions, établies après une analyse de causalité de Granger, entre les différents générateurs. Ici, les couches corticales infragranulaires (IG) sont les premières génératrices d'oscillations alpha et entraînent leur propagation vers les couches granulaires (G) et supragranulaires (SG). A, d'après Lopes Da Silva et Storm Van Leeuwen, 1977 ; B, d'après Bollimunta et coll., 2008.

Les oscillations rythmiques alpha les plus amples apparaissent dans les cortex visuels lorsque les sujets ont les yeux fermés, le rythme mu le plus intense, lui, émerge dans les cortex somatosensoriels lors d'une relaxation musculaire naturelle (Chang et coll., 2012). Une activité corticale de fond dominée par des oscillations de la bande alpha a donc été interprétée comme indicative d'un état cortical « quiescent » (Adrian et Matthews, 1934). Dans cette optique, des travaux réalisés par magnétoencéphalographie lors desquels les observateurs devaient rapporter avoir vu un repaire dans une zone du champ visuel préalablement indiquée ont montré une augmentation de la puissance relative des oscillations alpha dans les aires corticales correspondantes aux parties du champ visuel non concernées par l'indication. Ces études ont permis d'établir une corrélation inverse entre la puissance relative du rythme alpha occipital et l'attention portée à un point dans scène visuelle (Rihs et coll., 2007, 2009).

1.1.2.1.2 *Le rythme Thêta*

Les activités de type thêta sont comprises dans la bande 4-8 Hz chez le primate (Kahana et coll., 2001) et 6-10 Hz chez le rongeur (Buzsáki, 2002), elles ont été enregistrées dans le cortex cérébral et l'hippocampe de rat, singe et humain (Buzsáki, 2002; Jacobs et coll., 2007; Kahana et coll., 2001; Siapas et coll., 2005; Stewart et Fox, 1991).

Les mécanismes cellulaires à l'origine du rythme thêta hippocampique sont encore très discutés mais plusieurs études suggèrent que ces oscillations sont issues des neurones

pyramidaux de la corne d'Ammon (CA1) dont la décharge rythmique est modulée par une succession d'entrées synaptiques inhibitrices au niveau des dendrites basilaires et apicales (Amzica et Lopes da Silva, 2005; Klausberger et Somogyi, 2008). Les courants somatiques sortants, générés par cette différence de polarité entre les compartiments cellulaires des neurones pyramidaux du CA1, participent à l'oscillation du potentiel extracellulaire à la fréquence thêta (Fig. 4, Klausberger et Somogyi, 2008; Leung, 1998). De plus, les transmissions inhibitrices provenant des interneurons hippocampiques permettraient aux neurones pyramidaux du CA1 de mettre en jeu les courant cationiques I_H , activés lors de l'hyperpolarisation et potassiques I_M dont l'interaction facilite la décharge rythmiques des neurones dans la bande de fréquence thêta (Buzsáki et coll., 1986; Klausberger et Somogyi, 2008; Soltesz et Deschenes, 1993).

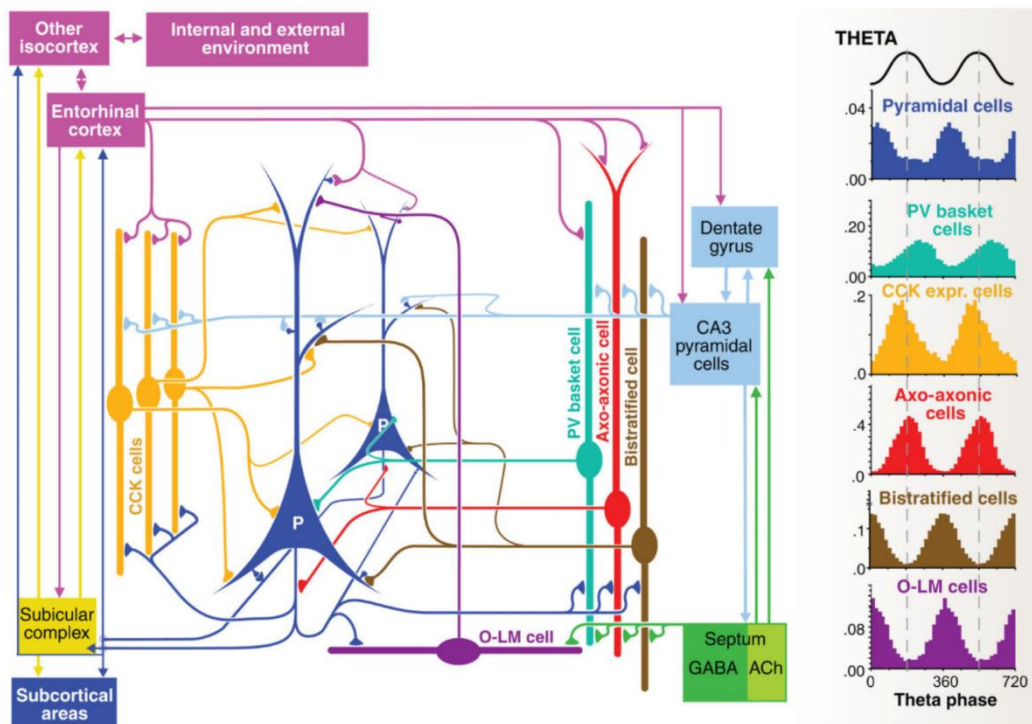


Figure 4 : Interaction spatiotemporelle entre les cellules pyramidales et différentes classes d'interneurones du CA1. Le panneau de gauche est une représentation schématique de la connectivité au sein du *stratum pyramidale* hippocampique. Les cellules pyramidales du CA1 (P) reçoivent de nombreuses connexions des interneurons inhibiteurs réparties sur toute leur surface. Les histogrammes de probabilité de décharge représentés à droite montrent que la décharge de chaque classe d'interneurones innervant les différents domaines cellulaires des neurones pyramidaux a une relation temporelle spécifique avec la phase de l'oscillation thêta enregistrée dans le milieu extracellulaire. PV : interneurons exprimant la parvalbumine ; CCK : interneurons exprimant la cholécystokinine ; O-LM : interneurons du stratum lacunosum moleculare ; ACh : acétylcholine.

Chez le rat, la synchronisation de la décharge des cellules pyramidales hippocampiques dans la bande de fréquence thêta permet un codage de l'information liée à la navigation spatiale. Les cellules de lieu sont des neurones pyramidaux situés dans le CA1 dont la décharge est associée à la proximité ou l'éloignement d'une localisation spatiale donnée et dont l'activité collective permet l'établissement d'une « carte cognitive » de l'environnement (O'Keefe et Nadel, 1978). L'enregistrement de la décharge de plusieurs cellules de lieu aux champs récepteurs adjacents lors du déplacement de l'animal a permis de révéler que sa relation de synchronie avec la phase du cycle de l'oscillation thêta subit un décalage temporel corrélé à l'éloignement de l'animal avec chacun des champs récepteurs des cellules de lieu. Cette précession de phase de la décharge permet une « relecture » de la trajectoire de l'animal dans son environnement (O'Keefe et Nadel, 1978; O'Keefe et Recce, 1993; Skaggs et coll., 1996). L'application d'un protocole de stimulations électriques tétaniques dans le CA1 au moment du pic de la phase positive de l'oscillation thêta a été associée à une nette augmentation de l'amplitude des réponses synaptiques des mêmes réseaux pouvant durer jusqu'à plus d'une heure. Cette observation démontre le rôle important de la synchronisation des réseaux hippocampiques au rythme thêta pour établir des phénomènes de plasticité à long terme (Hölscher et coll., 1997). Celle-ci pourrait aussi jouer un rôle à la synapse reliant l'hippocampe et le cortex préfrontal (Swanson, 1981) puisque l'augmentation simultanée de la synchronisation de phase des neurones avec l'oscillation thêta dans ces deux structures a été mesurée lors de tâches d'exploration d'un environnement connu. La synchronisation de phase de la décharge des neurones hippocampiques et corticaux avec l'oscillation thêta extracellulaire serait donc impliquée dans l'établissement d'une mémoire corticale à long terme (Jones et Wilson, 2005; Siapas et coll., 2005). Chez l'humain, les oscillations de la bande de fréquence thêta dans plusieurs aires corticales ont été associées à l'exécution de tâches de mémorisation spatiale, la puissance spectrale des oscillations thêta augmentant lorsque les sujets se déplaçaient dans un labyrinthe virtuel (Kahana et coll., 1999).

1.1.2.1.3 Les rythmes Béta-Gamma

Les activités béta et gamma sont des oscillations rapides de plus faible amplitude dont les fréquences se situent respectivement entre 13 et 35 Hz et au-delà de 35 Hz (Fig. 2B). Elles sont enregistrables à l'EEG dans la plupart des aires corticales mais sont plus présentes dans les aires frontales et centrales (Chang et coll., 2012).

L'enregistrement d'une synchronie de ces activités dans les aires visuelles et d'autres aires corticales distantes couplé à l'absence de synchronie dans le noyau géniculé latéral du thalamus en réponse à des stimulations visuelles pendant l'éveil du chat laisse supposer une genèse corticale des activités de la bande bêta-gamma (Gray et coll., 1989). Cependant, la synchronisation d'activités spontanées à 30 – 40 Hz entre le cortex et le thalamus chez le chat éveillé démontre la participation des afférences thalamo-corticales dans l'établissement de des oscillations synchrones de la bande bêta-gamma enregistrées dans des aires corticales distantes (Steriade et coll., 1996). De plus la stimulation des noyaux cholinergiques de la formation réticulée du tronc cérébral connectés aux différents noyaux du thalamus ainsi qu'au cortex entraîne l'apparition d'oscillations rapides de fréquence bêta-gamma dans le cortex (Fig. 5B; Moruzzi et Magoun, 1949).

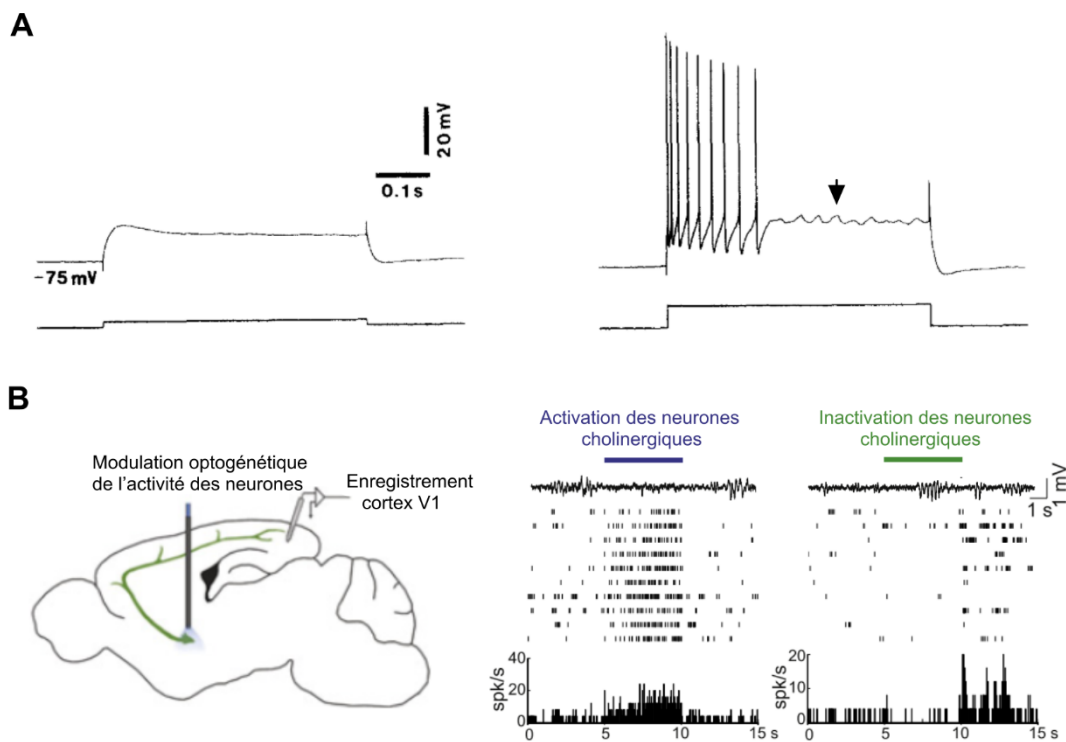


Figure 5 : Génération des rythmes Bêta-Gamma. A, Enregistrement intracellulaire *in vitro* d'un neurone du gyrus suprasylvien de chat montrant l'apparition d'oscillations intrinsèques (flèche) de fréquence bêta-gamma, ici 30 Hz lorsque dépolarisé à des potentiels supérieurs à -60 mV. B, Gauche : Représentation schématique du protocole expérimentale. Droite : L'activation optogénétique (barre bleue) des neurones cholinergiques du prosencéphale basale entraîne une « désynchronisation » dans le LFP cortical (trace du haut) et une augmentation de la décharge des neurones corticaux (raster et décharge moyenne). Noter la fréquence de décharge > 20 Hz des neurones lors de l'activation (Gauche, Bas). D'autre part, l'inhibition optogénétique (barre verte), des mêmes neurones, entraîne l'émergence d'activités synchrones plus lentes dans le LFP cortical et la nette diminution de la fréquence de décharge des neurones du cortex (Droite). A, d'après Nuñez et coll., 1992 ; B, modifié d'après Lee et Dan, 2012.

Il a été démontré *in vitro* que les neurones et interneurons corticaux, lorsque maintenus à des valeurs de potentiel membranaire au-dessus de -60 mV présentaient des oscillations spontanées de fréquences comprises dans la bande bêta-gamma et pouvant occasionnellement déclencher la décharge de PAs (Fig. 5A; Llinas et coll., 1991; Nuñez et coll., 1992). Ces propriétés oscillatoires sont partagées par certains neurones des noyaux thalamiques avec, cependant, une plus grande propension à déclencher des PAs (Steriade et coll., 1991a, 1993a) augmentée après des stimulations du noyau pédonculopontin (Steriade et coll., 1991a). Ainsi, les transmissions cholinergiques des neurones du tronc cérébral et du prosencéphale basal entraînent la dépolarisation des neurones du cortex et du thalamus qui se mettent à osciller à des fréquences de la bande bêta-gamma. La décharge de PAs par les neurones du cortex permet une propagation cortico-corticale de ces oscillations et la synchronisation des réseaux corticaux locaux (Chagnac-Amitai et Connors, 1989) mais aussi leur transmission aux autres aires corticales plus distantes par le biais des connexions réciproques entre cortex et thalamus (Cunningham et Levay, 1986). Il est cependant important de noter que, bien que la genèse corticale des rythmes bêta et celle des rythmes gamma soit similaire, leur propagation au sein des réseaux corticaux semble dépendre de mécanismes différents. En effet, Les activités rapides enregistrées *in vitro* dans le cortex somatosensoriel de rat étaient dominées par des oscillations de la gamme bêta (13 – 35 Hz) dans les couches profondes du cortex qui résistaient au blocage de la transmission synaptique, suggérant l'implication des jonctions GAP dans leur propagation. Les activités rapides des couches superficielles du cortex, elles, étaient dominées par des oscillations de la bande gamma (> 30 Hz) abolies par l'application d'un bloquant chimique de la transmission inhibitrice GABA_A suggérant l'implication des interneurons inhibiteurs dans le maintien de la synchronie corticale du rythme gamma (Roopun et coll., 2006).

L'augmentation de synchronie pour les activités des bandes bêta-gamma est généralement associée à la réalisation de tâches motrices nécessitant des processus attentionnels. Par exemple, chez le macaque rhésus, la synchronisation des activités EEG de la bande bêta-gamma dans les aires visuelles était associée à l'association stimulus – réponse lors d'une tâche de reconnaissance de stimulus visuel (Freeman et van Dijk, 1987). Chez le macaque *in vivo*, une augmentation de la puissance relative des oscillations de fréquence 25 – 35 Hz a été mesurée dans les aires somesthésiques lors de la récupération à l'aveugle de raisins, tâche demandant une exploration tactile et proprioceptive de l'environnement (Murthy et Fetz, 1992). De plus, la synchronisation des populations neuronales d'aire corticales distantes à la fréquence gamma

ainsi que la relation entre leur activité de décharge et la phase de l'oscillation extracellulaire auraient un rôle dans la sélection d'informations sensorielles pertinentes d'un point de vue comportemental (Fries, 2009; Fries et coll., 2001). Finalement, le décalage entre la décharge des neurones et la phase de l'oscillation de fréquence gamma extracellulaire dans le cortex (Vinck et coll., 2010) a été proposé comme mécanisme facilitateur de l'établissement de phénomènes plastiques à long-terme au niveau des synapses cortico-corticales puisqu'influant sur la relation temporelle entre les décharges pré et postsynaptiques (Wespatat et coll., 2004; Womelsdorf et coll., 2007), base de la *spike-timing dependent plasticity* (Markram et coll., 1997).

1.1.2.2 Les rythmes du sommeil

L'approfondissement du sommeil, de l'endormissement au sommeil profond, est corrélé à un ralentissement progressif et une augmentation de l'amplitude des oscillations captées par l'EEG. Les stades du sommeil (1 à 4) se succèdent de façon cyclique au cours de la nuit et sont caractérisés par des patrons d'activité EEG spécifiques (Fig 2A, C; Dement et Kleitman, 1957).

1.1.2.2.1 Les fuseaux de sommeil

Enregistrés à l'EEG lors des phases d'endormissement ou les stades précoces du sommeil (stade 2) dans les aires frontales du cortex, les fuseaux de sommeil (ou *spindles*) sont des patrons oscillatoires survenant environ toutes les 2 secondes et dont la fréquence interne se situe entre 7 et 14 Hz chez le chat ou entre 13 et 15 Hz chez le rat (Fig. 2B). Lorsqu'associés aux ondes lentes, ils forment un grapho-élément biphasique de grande amplitude appelé « complexe K » (Fig. 2C). Des expériences impliquant l'ablation du cortex chez le chat ont pu montrer que les fuseaux de sommeil ont une origine thalamique (Morison et Bassett, 1945) mais que leur forme ainsi que leur synchronisation au sein du thalamus dépendent de l'activité de fond des réseaux corticaux (Fig. 6A; Amzica et Steriade, 2000; Contreras et coll., 1997).

La genèse des fuseaux du sommeil se situe au niveau des neurones GABAergiques du noyau réticulaire du thalamus (nRT). Ces oscillations rythmiques mettent en jeu les connexions réciproques entre les neurones du nRT et les neurones thalamo-corticaux (Fig. 6B) ainsi que les propriétés intrinsèques des neurones thalamiques notamment le courant calcique à bas seuil I_T . Inactivé à des valeurs de potentiel membranaire situées entre -55 et -60 mV, celui-ci se dé-

inactive lors d'une hyperpolarisation du potentiel membranaire (Crunelli et coll., 1989), rendant ainsi le courant activable par une dépolarisation qui déclenche un rebond de potentiel membranaire et finalement la décharge de PAs. Durant les premières phases du sommeil, la déinactivation des conductances calciques liée à l'hyperpolarisation des neurones du nRT permet une inhibition rythmique des neurones thalamo-corticaux. La décharge de PAs à bas seuil de ceux-ci produit, dans les neurones corticaux, des potentiels postsynaptiques dépolarisants pouvant atteindre le seuil de déclenchement des PAs et ainsi renforcer la synchronisation des fuseaux par leurs afférences sur le nRT (Fig. 6B).

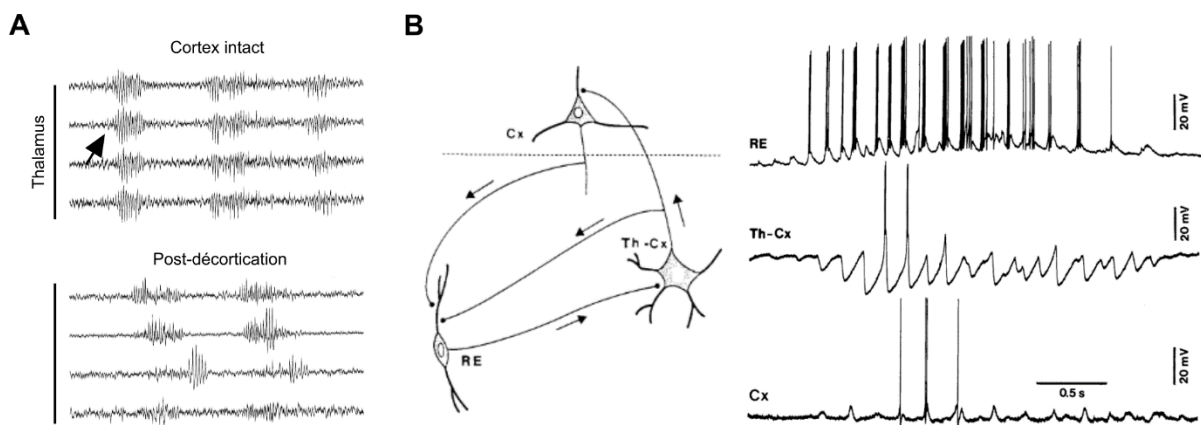


Figure 6 : Emergence et synchronisation des fuseaux de sommeil au sein de la boucle thalamo-corticale. A, Enregistrements LFP chez le chat de 8 régions thalamiques dans un réseau thalamo-cortical intact (Haut) et l'enregistrement des mêmes régions après ablation du cortex (Bas). Dans le cerveau intact, on peut observer trois périodes synchrones de fuseaux de sommeil (flèche) sur toutes les électrodes. La décorticalisation de l'animal n'affecte pas la survenue des périodes de fuseaux mais leur synchronisation dans les régions thalamiques enregistrées. **B,** Le versant intracellulaire des fuseaux de sommeil dans la formation réticulaire du thalamus (RE), les noyaux de relai thalamo-corticaux (Th-Cx) et le cortex (Cx) correspondant. Dans la représentation schématique (Gauche) les flèches indiquent le sens des interactions entre les différents types cellulaires. A, B et C d'après Amzica et Steriade, 2000.

Les fuseaux, comme d'autres patrons d'activités, tels que les ondes lentes, émergent durant les différents stades du sommeil sont associés à des processus impliquant la consolidation mnésique. Ainsi lors d'études effectuées chez des sujets entraînés à réaliser une tâche motrice spécifique, la quantité d'évènements de type fuseaux de sommeil enregistrés durant les périodes d'endormissement était corrélée positivement à la performance des sujets lors de la reproduction de la tâche apprise, le jour suivant (Nishida et Walker, 2007).

1.1.2.2 Les ondes delta

Lors du sommeil profond (stades 3 et 4), l'activité EEG ralentit vers des fréquences situées entre 1 et 4 Hz (Fig. 2B ; Fig. 7A) et l'amplitude de ses fluctuations de potentiel augmente, indiquant une plus grande synchronisation des neurones corticaux sous-jacents, particulièrement dans les régions antérieures du cortex (Chang et coll., 2012). La persistance des ondes delta chez le rat après une ablation du cortex laisse supposer que ces ondes sont générées dans le thalamus (Steriade et coll., 1987).

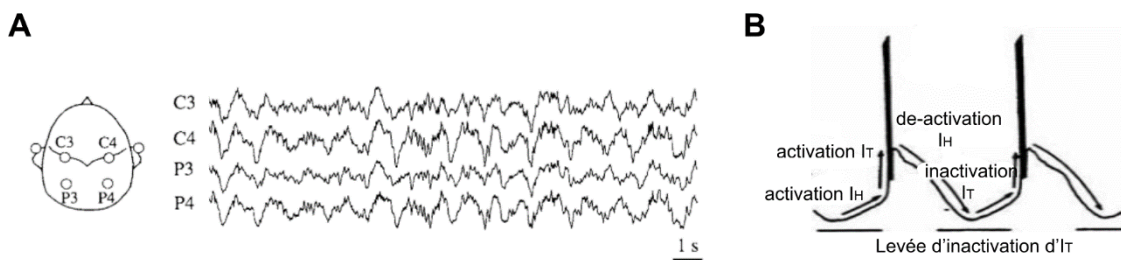


Figure 7 : Les ondes delta du sommeil profond émergent des propriétés intrinsèques des neurones thalamiques. A, Enregistrement EEG multi-site réalisé chez l'humain durant le sommeil profond (stade 3 – 4) et montrant des oscillations de la bande delta caractérisées par une fréquence située entre 1 et 4 Hz et une forte cohérence spatiotemporelle. B, Représentation schématique de la mise en jeu rythmiques des conductances sodiques/potassiques (I_H) et calciques (I_T) faisant suite à l'hyperpolarisation des neurones thalamo-corticaux. Les flèches représentent l'évolution de potentiel membranaire au cours du temps. A, d'après Amzica et Steriade, 1997 ; B, d'après McCormick et Pape, 1990.

Les ondes du sommeil de fréquence delta sont générées par l'action conjointe de deux courants au sein des neurones thalamo-corticaux (Steriade, 2006) : le courant I_T et le courant I_H qui s'active lors d'une hyperpolarisation du potentiel transmembranaire, générant une lente dépolarisation de la membrane (Leresche et coll., 1991; McCormick et Pape, 1990). L'hyperpolarisation des neurones thalamo-corticaux lors du sommeil déclenche l'activation du courant I_H et la dé-inactivation de la conductance calcique I_T (Fig. 7B), I_H dépolarise lentement le potentiel de membrane jusqu'à l'activation des courant I_T déclenchant des PAS de « rebond ». Le potentiel membranaire se trouvant ainsi dépolarisé, les courants I_T s'inactivent et I_H se désactivent, ceci entraîne une hyperpolarisation du potentiel de membrane et donc une reprise

du cycle (Fig. 7B). Bien qu'émergeant de l'interaction de propriétés intrinsèques des neurones thalamo-corticaux, les activités delta peuvent être synchronisées dans les réseaux thalamiques par des afférences corticales, notamment sur le nRT (Steriade et coll., 1991b).

1.1.2.2.3 Les ondes lentes

Avec l'augmentation de profondeur du sommeil, les activités EEG se ralentissent. On observe alors d'amples fluctuations de potentiel à des fréquences inférieures à 1 Hz (Fig. 2B; Fig. 8; Sejnowski et Destexhe, 2000). Les ondes lentes ont une origine corticale (Steriade et coll., 1993b; Timofeev et Steriade, 1996) au niveau des régions frontales (Finelli et coll., 2000; Massimini et coll., 2004). Leur forte cohérence spatio-temporelle au sein du cortex dépend des communications cortico-corticales comme le montre la perte de synchronisation de phase des oscillations après déafférentation antéro-postérieure du cortex chez le chat (Fig. 8; Amzica et Steriade, 1998).

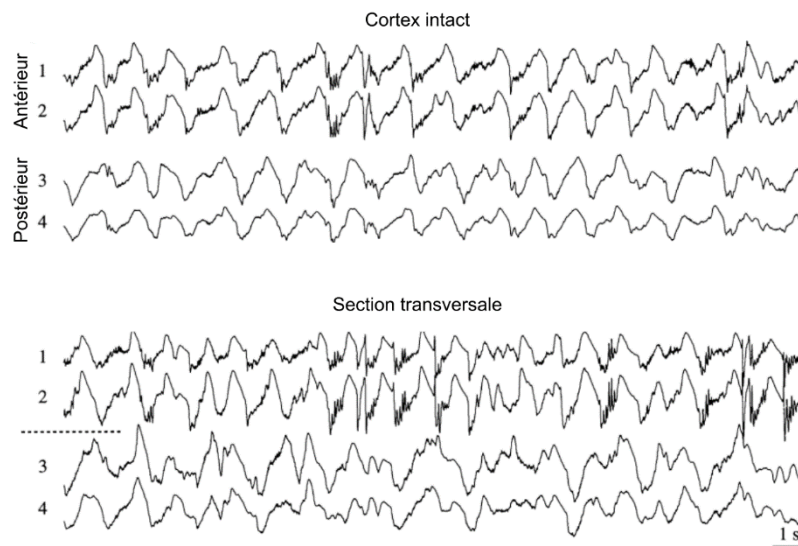


Figure 8 : Effet de la déafférentation corticale sur la cohérence spatio-temporelle des ondes lentes. Enregistrement EEG multisite chez le chat durant une période de sommeil lent. Les sites 1 et 2 sont plus antérieurs que les sites 3 et 4. Dans le cortex intact, des oscillations synchrones de fréquence 0,7 Hz sont observables au niveau des 4 électrodes (Haut). Une coupe transversale est réalisée, séparant les sites 1 – 2 des sites 3 – 4 (ligne pointillée, Bas). On observe alors que les sites antérieurs et postérieurs oscillent indépendamment mais que la synchronie entre sites adjacents persiste ce qui montre que les connexions cortico-corticales sont indispensables à l'établissement d'une synchronie distante entre les aires corticales. Modifié d'après Amzica et Steriade, 1998.

Au niveau des neurones corticaux les ondes lentes sont caractérisées par une succession de périodes hyperpolarisées dénuées de décharge de PAs (l'état « bas ») et de périodes dépolarisées surmontées de décharges de PAs (l'état « haut ») donnant à la distribution

moyenne du potentiel membranaire un profil bimodal (Fig. 9A). La phase dépolarisée consiste en un barrage intense de potentiel postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs issu des réseaux corticaux locaux et l'activation d'un courant sodique dit persistant (I_{NaP}) (Steriade, 2003). Le profil d'activité enregistré dans les neurones corticaux durant les phases dépolarisées n'est pas sans rappeler celui rencontré durant les périodes d'éveil puisque les conductances impliquées, la distribution du potentiel membranaire ainsi que le patron général de décharge observés dans les neurones corticaux lors des états hauts est similaire aux états dits « activés » (Chapitre 1.1.2.1; Destexhe et coll., 2007; Rudolph et coll., 2007). La phase hyperpolarisée serait la conséquence d'une disfacilitation (un arrêt transitoire des activités synaptiques) des réseaux thalamo-corticaux plutôt que d'une augmentation transitoire de l'inhibition corticale compte tenu de l'abolition de la décharge des interneurons inhibiteurs et la persistance de l'hyperpolarisation des neurones pyramidaux lorsqu'enregistrés avec des pipettes chargées en chlore (Steriade et coll., 2001; Timofeev et coll., 2001). L'activation de conductances potassiques calcium-dépendantes semble aussi prendre part à l'hyperpolarisation. En effet la stimulation des noyaux cholinergiques des structures mésopontines entraîne l'activation des récepteurs muscariniques corticaux qui ont un effet inhibiteur sur les conductances potassiques calcium-dépendantes (McCormick, 1992) et participent à l'abolition des états « bas » (Fig. 9B; Rudolph et coll., 2005; Steriade et coll., 1993c).

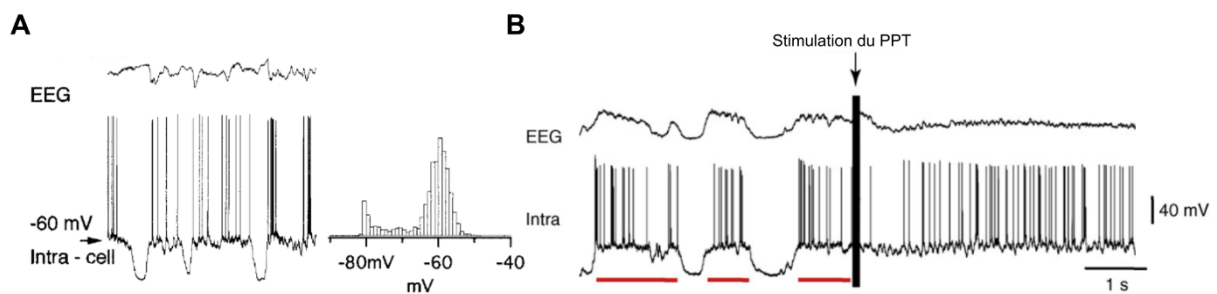


Figure 9 : Alternance d'états « haut » et « bas » durant le sommeil à ondes lentes et son interruption par la transmission cholinergique du noyau pédonculopontin (PPT). **A,** L'enregistrement conjoint des activités EEG (trace du haut) et intracellulaires (trace du bas) dans le cortex de chat profondément endormi montre que chaque phase de l'oscillation lente dans l'EEG est associée à un état particulier dans le neurone. L'histogramme de droite montre que la distribution moyenne des valeurs de potentiel de membrane lors de cette succession d'états « haut » et « bas » a un profil bimodal. **B,** Chez le chat anesthésié à la kétamine-xylazine pour mimer l'activité de fond observée durant le sommeil à ondes lentes, les activités EEG et intracellulaire sont initialement synchronisées à des fréquences lentes. Le neurone cortical a un profil bistable alternant états « hauts » (barres rouges) et « bas ». La stimulation électrique du PPT induit un état « activé » typique des périodes d'éveil. Le patron EEG semble désynchronisé, le potentiel membranaire du neurone cortical est dépolarisé et son activité de décharge devient plus intense et erratique. A, Adapté d'après Steriade et coll., 2001 ; B, Modifié d'après Rudolph et coll., 2005.

De nombreuses études ont montré que les oscillations lentes du sommeil participent à des processus de consolidation mnésique. Huber et ses collègues (2004) ont, par exemple, appris à des sujets une tâche sensorimotrice mettant en jeu spécifiquement les aires pariétales du cortex et ont pu mettre en évidence une corrélation entre la synchronie locale des ondes lentes durant le sommeil et la performance des sujets durant le rappel de la tâche apprise (Huber et coll., 2004). Des états « hauts » successifs, en particulier, émergent des grapho-éléments très rapides (100 – 250 Hz), les *sharp wave ripples* (Fig. 2B, C; Battaglia et coll., 2004), qui ont été associés de manière causale à la consolidation de mémoire spatiale chez le rat (Girardeau et coll., 2009; Maingret et coll., 2016).

1.1.2.3 Impact des activités corticales spontanées sur l'excitabilité neuronale

Comme nous l'avons vu, les différents rythmes cérébraux sont associés à des patrons spécifiques d'activité synaptique. Au sein des neurones, la modification de la fréquence et l'intensité du barrage synaptique entraîne des modifications de 1) la valeur moyenne du potentiel membranaire, 2) l'amplitude de ses fluctuations 3) la résistance d'entrée et 4) la constante de temps membranaire des neurones. Ces trois paramètres influent directement sur la relation entrée-sortie des neurones, c'est-à-dire leur capacité à répondre par une décharge de PAs à une entrée synaptique donnée.

Dans les neurones du cortex visuel de chat ou du cortex à tonneaux de rat, la manipulation du potentiel membranaire par des injections directes de courant a montré qu'à des potentiels plus hyperpolarisés, la relation entrée-sortie des neurones corticaux était translatée vers la droite, indiquant une augmentation de l'intensité des courants nécessaires à entraîner la décharge de PAs (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Azouz et Gray, 1999; Sanchez-Vives et McCormick, 2000). Ainsi, l'éloignement du potentiel de membrane des neurones par rapport au seuil de déclenchement des PAs a une incidence sur l'intensité de l'entrée synaptique nécessaire à déclencher une réponse supraliminaire. Les différents niveaux de synchronie des entrées synaptiques entraînent des variations de l'amplitude des fluctuations du potentiel de membrane, des entrées excitatrices synchronisées étant associées à des dépolarisations de potentiel transmembranaire plus importantes. Dans le cortex visuel de chat *in vivo*, l'application de stimulations visuelles plus ou moins intenses entraîne une modification de l'amplitude des fluctuations synaptiques se répercutant sur la distribution moyenne des valeurs de potentiel membranaire (Fig. 10A, B; Cardin et coll., 2008). Les modifications de la distribution

statistique des valeurs de potentiel transmembranaire ont un impact direct sur la variabilité des réponses synaptiques et la probabilité de décharge des neurones corticaux (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017).

La libération de neurotransmetteurs active les récepteurs-canaux postsynaptiques excitateurs ou inhibiteurs selon le type de synapse. L'ouverture des canaux entraîne l'augmentation de la conductance synaptique spécifique du sodium, du potassium, du calcium ou encore du chlore. La somme de ces conductances synaptiques influe sur la valeur de la conductance membranaire globale (G_m), modifiant la relation ohmique courant-voltage où ΔV_m est la réponse en voltage à la somme des courants traversant la membrane (I_m).

$$\Delta V_m = \frac{I_m}{G_m}$$

Ainsi, chez le chat *in vivo*, la suppression d'activité de décharge des neurones afférents par injection locale de tétrodotoxine (TTX) entraîne la multiplication par 5 de la résistance membranaire (Destexhe et coll., 1999; Paré et coll., 1998 mais voir Waters et Helmchen, 2006) ce qui confirme la participation majeure des conductances synaptiques à la valeur de la conductance membranaire globale mesurée au soma. Des études *in vivo* menées chez le chat anesthésié à la kétamine/xylazine, mimant la succession d'états « hauts » et « bas » observés lors du sommeil à ondes lentes, ont montré qu'une réduction de la fréquence des entrées synaptiques augmentait, lors du passage de l'état « haut » à l'état « bas », drastiquement les valeurs de la résistance d'entrée et de la durée de charge de la membrane des neurones corticaux (Destexhe et coll., 1999; Paré et coll., 1998). La diminution de résistance membranaire des neurones entraîne une baisse de l'amplitude de la réponse en voltage à une entrée de courant mais également une diminution de leur constante de temps membranaire (T_m), réduisant le temps de charge de la membrane et donc la possible sommation temporelle des entrées synaptiques excitatrices.

La modulation de la fréquence des entrées synaptiques par des stimulations visuelles sinusoïdales *in vivo* ou l'injection contrôlée de conductances synaptiques *via* la technique du *dynamic-clamp in vitro* entraînaient l'augmentation (opération multiplicative) ou la diminution (opération divisive) de la pente de la relation entrée-sortie des neurones enregistrés (Fig. 10C; Cardin et coll., 2008; Chance et coll., 2002). Ainsi les propriétés dites « passives » de membrane ont un impact crucial sur le codage en taux de décharge des courants synaptiques entrants fait au sein des neurones.

De manière générale, les propriétés d'excitabilité des neurones corticaux sont éminemment dépendantes de l'activité collective des réseaux dans lesquels ils s'insèrent, celles-ci variant en continu au gré des fluctuations de fréquence et d'intensité du « bruit synaptique ».

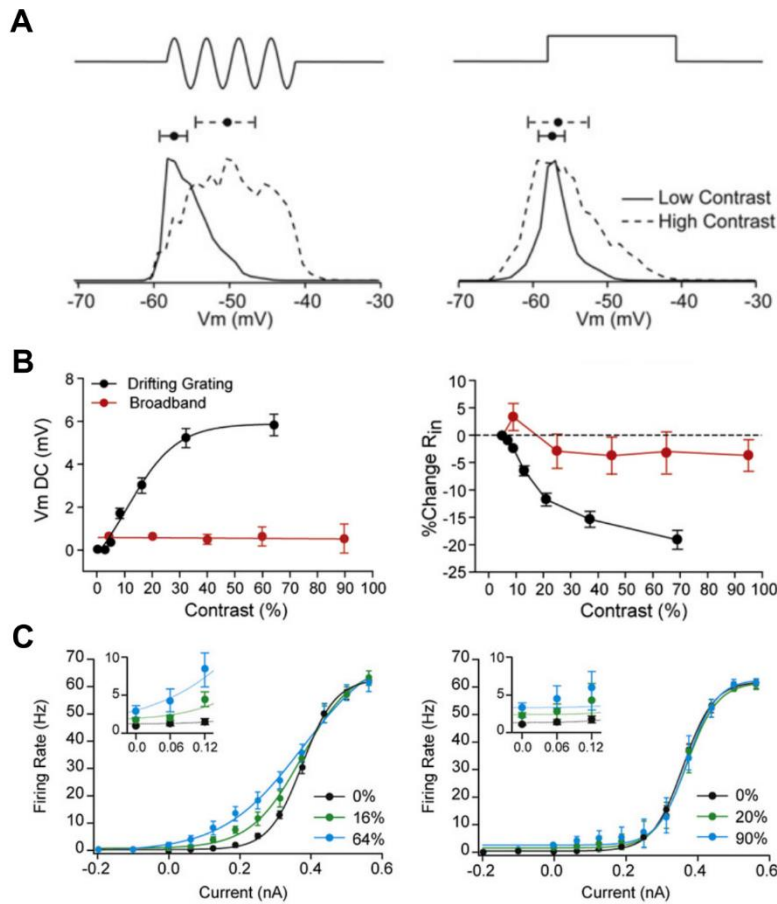


Figure 10 : Modulation stimulus-dépendante de la relation entrée-sortie chez le chat anesthésié au thiopental *in vivo*. **A**, Impact différentiel de l'augmentation d'intensité (contraste) de deux types de stimuli visuels (« grilles dérivantes », gauche ; « bandes larges », droite) sur la distribution du potentiel membranaire d'un neurone du cortex visuel primaire. L'augmentation d'intensité induit une augmentation de l'amplitude des fluctuations membranaires associées à une dépolarisation membranaire uniquement lorsque l'animal est exposé à des grilles dérivantes (gauche). **B**, Comparaison des variations de potentiel membranaire moyen (Vm DC) et de résistance membranaire (Rin) induites par l'augmentation d'intensité de chaque stimulus. L'intensité du stimulus de type « bandes larges » n'affecte ni le potentiel membranaire moyen ni la résistance membranaire. **C**, Modulation de la relation entrée-sortie du neurone par l'augmentation de l'intensité du stimulus. La dépolarisation de potentiel membranaire associée à une augmentation

de l'amplitude des fluctuations de voltage ainsi qu'à une diminution de résistance membranaire affecte le gain et la sensibilité du neurone. En revanche, la modulation de l'amplitude des fluctuations de voltage n'affecte pas la relation entrée-sortie du neurone. Adapté de Cardin et coll., 2008.

1.1.2.4 Autres potentiels cérébraux

Le premier amplificateur EEG utilisé par Berger était un amplificateur « en courant direct » (EEG DC ou DC-EEG) ne disposant d'aucun filtre intégré (Berger, 1929). Aujourd'hui, pour empêcher leur saturation, les amplificateurs EEG conventionnels sont construits avec un filtre passe-haut à 0,5 Hz (Vanhatalo et coll., 2012). Cette particularité technique empêche l'enregistrement de fluctuations physiologiques lentes (< 0,5 Hz) pouvant être des composantes essentielles du signal EEG (Vanhatalo et coll., 2012). Finalement, la suppression des filtres de l'EEG fait apparaître des rythmes ultra-lents mais aussi des événements de très longue durée (> 10 s) ne se répétant pas et ne pouvant être considérés comme des oscillations (Bullock et coll., 2003).

1.1.2.4.1 Les rythmes ultra-lents

Les activités EEG ultra-lentes sont des fluctuations de potentiel rythmiques avec une fréquence inférieure à 0,5 Hz (Fig. 11A). Ces oscillations ont été enregistrées dans de nombreuses aires corticales durant les périodes d'éveil et les différents stades du sommeil (Girton et coll., 1973; Vanhatalo et coll., 2004). Les activités ultra-lentes sont coalescentes à des activités rapides (Fig. 11A) car elles reflètent le déficit graduel de charges positives du milieu extracellulaire dû aux activités neuronales soutenues. Ainsi le rythme ultra-lent est étroitement corrélé avec les périodes d'activité EEG rapide ou encore des grapho-éléments comme le complexe-K ou les pointes épileptiformes (Vanhatalo et coll., 2012). Elles ont donc été identifiées comme le reflet d'une fluctuation de l'excitabilité neuronale (Penttonen et coll., 1999; Vanhatalo et coll., 2012) elle-même causée par des mécanismes cycliques comme l'activation des structures sous-corticales neuromodulatrices lors du cycle veille-sommeil (Usher et coll., 1999; Vanhatalo et coll., 2004). Cette hypothèse est renforcée par l'enregistrement chez l'homme de rythmes de fréquence inférieure à 0,1 Hz et leur association à des activités EEG plus rapides lors de la réalisation de tâches de détection somesthésique. Dans cette étude, la capacité des sujets à détecter le stimulus était étroitement corrélée à la phase de l'oscillation ultra-lente dans les aires somesthésiques (Fig. 11B; Monto et coll., 2008).

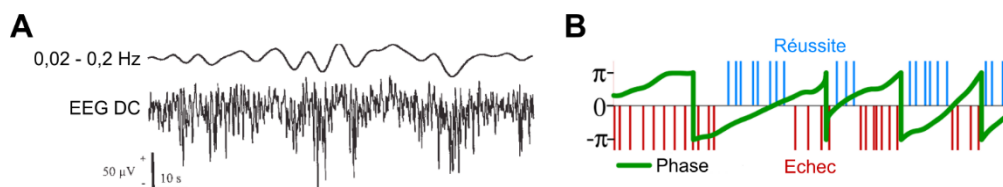


Figure 11 : Les ondes ultra-lentes et leur implication fonctionnelle. **A**, Exemple de tracés EEG chez l'humain durant une période de sommeil à ondes lentes. L'EEG dépourvu de filtre (bas) montre des fluctuations $< 0,1$ Hz mises en évidence par l'application d'un filtre passe-bas (haut). Noter que les phases ascendantes de l'oscillation ultra-lente sont associées à une diminution de l'amplitude des rythmes plus rapides. **B**, Chez des sujets réalisant une tâche de détection somesthésique, la phase de l'oscillation ultra-lente (trace verte) est corrélée avec le temps de réaction donc la performance cognitive (barres colorées). A, modifié d'après Vanhatalo et coll., 2004 ; B, adapté d'après Monto et coll., 2008.

1.1.2.4.2 *Le potentiel DC*

Le terme potentiel *DC* est historiquement employé pour désigner un enregistrement électrophysiologique avec un minimum de fréquence de 0 Hz, malgré l'impossibilité d'enregistrer une réponse fréquentielle à 0 Hz puisque celle-ci se manifesterait par un tracé plat. Le changement de potentiel *DC* ou *DC shift* désigne, dans la littérature, des phénomènes EEG variant de façon extrêmement lente et pouvant durer de plusieurs secondes à plusieurs minutes (Fig. 12B; Amzica et Lopes da Silva, 2005; Vanhatalo et coll., 2012). Ils sont détectés lors de la comparaison de voltage entre l'extérieur et l'intérieur du cerveau (Fig. 12A) et sont donc enregistrés chez de nombreux mammifères et ont été enregistrés dans différents états de vigilance (Hornbein et Sorensen, 1972; Lüchl et coll., 2018; Nita et coll., 2004; Voipio et coll., 2003; Woody et coll., 1970). Par exemple, lors des états « hauts » du sommeil à ondes lentes ou durant des crises d'épilepsie, la forte activité de décharge des neurones provoque la mise en jeu de canaux potassiques et une augmentation du potassium extracellulaire (Somjen, 1979) et sa recapture par les cellules gliales entraîne leur dépolarisation qui se reflète par un DC shift négatif dans le milieu interstitiel (Amzica et Neckelmann, 1999; Caspers et coll., 1987). L'étude de la genèse des potentiels *DC* défie toutefois la conception selon laquelle tous les potentiels recueillis par l'EEG seraient d'origine neuronale ou gliale. Des changements de potentiels *DC* peuvent être générés au niveau de la barrière hématoencéphalique et se refléter dans l'EEG à la suite de modifications de la pression partielle en dioxyde de carbone (Hornbein et Sorensen, 1972; Woody et coll., 1970).

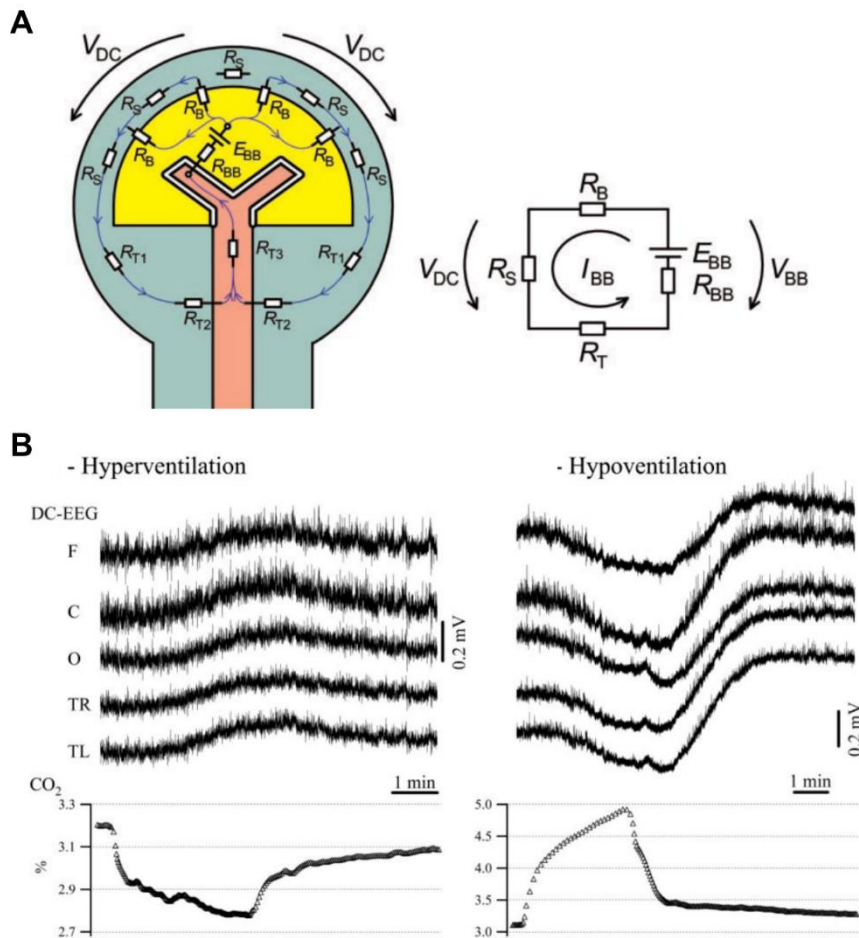


Figure 12 : Génération de DC shifts à l'EEG par conduction volumique depuis la barrière hématoencéphalique. **A**, Gauche : Représentation schématique de la tête humaine en 4 compartiments : le cerveau (jaune), le sang (rose), la barrière hématoencéphalique (BBB, double ligne noire) et les autres tissus (vert clair). E_{BB} , la force électromotrice de la source de tension de la BBB ; R_{BB} sa résistance interne ; R_B : la résistance électrique de l'interface cerveau-autres tissus ; R_S : la résistance électrique moyenne de l'interface méninges-surface de la peau ; R_T : résistance de retour du courant des tissus extra cérébraux vers le sang. Droite : Représentation simplifiée du schéma de gauche. **B**, Enregistrement EEG multisites (haut) chez le chat anesthésié à la kétamine-xylazine enregistré conjointement avec la concentration en CO_2 dans l'air expiré (bas). Dans cette expérience, l'hyperventilation (gauche) entraînait un DC shift positif dans l'EEG tandis que l'hypoventilation (droite) était associée à un DC shift négatif. A, d'après Voipio et coll., 2003 ; B, modifié d'après Nita et coll., 2004.

L'origine non-neuronale de potentiels *DC* de grande amplitude et pouvant durer plusieurs minutes a été confirmée et modélisée par Voipio et ses collaborateurs lors d'expériences d'hyperventilation chez des sujets humains (Voipio et coll., 2003). L'hyperventilation chez les sujets entraînait une alcalose du sang, génératrice de courant au niveau de la barrière hématoencéphalique. Selon le modèle de Voipio, le flux de courant ainsi généré passe par une série de résistances électriques associées aux différentes interfaces séparant le cerveau de la peau du crâne puis effectue une boucle de retour vers le sang. C'est ce retour qui, au niveau de la surface de la peau, génère le *DC shift* observé à l'EEG lors de

l'hyperventilation des sujets (Voipio et coll., 2003). De plus, des expériences réalisées chez le chat anesthésié ont montré que l'enregistrement de *DC shifts* extracellulaires induits par hyper ou hypoventilation n'était pas accompagné par des modifications du potentiel membranaire des neurones et cellules gliales (Nita et coll., 2004).

1.2 Les activités cérébrales altérées

1.2.1 Les activités induites par les anesthésiques

Les molécules anesthésiantes ont la propriété d'altérer l'état d'éveil. A faibles doses elles sont responsables d'amnésie, d'euphorie et peuvent engendrer des effets hypnotiques. Lorsqu'administrés à des concentrations plus importantes, les anesthésiques peuvent mener à une perte de conscience, une relaxation musculaire et une absence de réponse motrice à des stimuli douloureux, on parle alors d'anesthésie générale. Les molécules anesthésiantes sont généralement classées en fonction de leurs mécanismes d'action, en particulier sur les canaux ioniques.

1.2.1.1 Les molécules anesthésiques

1.2.1.1.1 Les agonistes GABAergiques

Les molécules anesthésiques de cette classe sont des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A. Ils se fixent sur les domaines transmembranaires des récepteurs et ont pour effet d'augmenter l'amplitude et la durée des courants postsynaptiques inhibiteurs (Krasowski et Harrison, 1999). De nombreux anesthésiques partagent ce mode d'action (Franks et Lieb, 1994), comme les éthers halogénés (anesthésiques volatiles) ou les benzodiazépines, le propofol ou les barbituriques (anesthésiques injectables) (Brown et coll., 2011). Lors d'une anesthésie aux barbituriques ou au propofol, la molécule atteint rapidement les centres de veille des structures pontines et de l'hypothalamus causant ainsi la perte de conscience (Brown et coll., 2010).

1.2.1.1.2 Les agonistes des récepteurs opioïdes

Figurent dans cette classe la morphine et ses dérivés synthétiques comme le fentanyl. Généralement utilisés comme substance analgésique, ils activent les récepteurs opioïdes situés dans la substance grise périaqueducule, la médulla rostroventrale et la moëlle épinière limitant

le traitement de l'information nociceptive par activation de la voie inhibitrice descendante (Brown et coll., 2011; Ferezou et coll., 2007). A plus forte dose, le fentanyl peut provoquer la perte de conscience, notamment en diminuant l'activité des neurones cholinergiques afférents du thalamus (PPT et tegmentum latérodorsal), impliqués dans la régulation des états de veille (Brown et coll., 2011; Mortazavi et coll., 1999; Steriade et coll., 1991b).

1.2.1.1.3 Les substances dissociatives

Les substances dites dissociatives, comme la kétamine, sont des inhibiteurs des récepteurs NMDA. Ils ont un effet bloquant sur la transmission nociceptive médiée par les récepteurs NMDA de la moelle épinière (Brown et coll., 2011; Kiefer et coll., 2008). Ces substances tirent leur nom des effets hallucinatoires qu'ils provoquent chez les sujets, notamment par le biais de leur action préférentielle sur les récepteurs NMDA des interneurons GABAergiques du cortex. Une augmentation des doses peut cependant entraîner la perte de conscience (Brown et coll., 2011).

1.2.1.2 Patrons EEG et activités intracellulaires induits par les anesthésiques

Par leur action dose-dépendante sur l'excitabilité cellulaire et la transmission synaptique au sein des réseaux neuronaux, les molécules anesthésiques, induisent des dynamiques d'activité EEG qui ressemblent à certains patrons rencontrés au cours du cycle veille-sommeil.

Les molécules qui potentialisent la transmission synaptique inhibitrice agissent sur les récepteurs GABA_A des neurones du tronc cérébral, du thalamus et du cortex (Brown et coll., 2011; Rudolph et Antkowiak, 2004). Administrées à concentrations modérées, elles induisent une activité EEG similaire aux fuseaux de sommeil (Fig. 13; Contreras et coll., 1997). Comme lors du sommeil naturel, l'activité EEG est caractérisée par des oscillations biphasiques rythmiques corrélées à de grandes dépolarisations synaptiques pouvant conduire à la décharge de PAs dans les neurones corticaux (Fig. 13; Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017; Mahon et coll., 2001). A fortes doses, ces anesthésiques entraînent un ralentissement progressif des activités EEG caractérisé par l'apparition d'un patron d'activité de type Burst-Suppression (B-S) puis d'un tracé isoélectrique dont les caractéristiques sont détaillées dans le paragraphe 1.3.2.

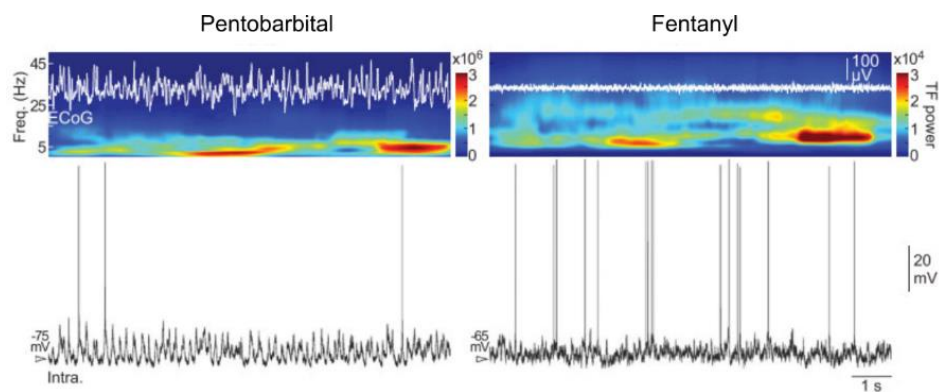


Figure 13 : Les molécules anesthésiques induisent des patrons d’activité synaptique spécifiques. Enregistrement simultané des signaux ECoG (haut) et intracellulaires (bas) de neurones pyramidaux des couches 5 du cortex à tonneaux chez le rat. Les cartes temps-fréquence des signaux ECoG montrent que l’activité corticale est dominée par des oscillations de fréquence 1 – 6 Hz lors de l’anesthésie aux barbituriques alors que le contenu spectral des activités spontanées sous fentanyl est plus riche, avec des fréquences rapides allant jusque 25 Hz. Adapté de Altwegg-Boussac et coll., 2014.

L’activité corticale de surface induite lors d’une sédation au fentanyl présente des fluctuations de faible amplitude et de fréquence relativement élevée qui ressemblent à l’EEG d’éveil (Fig. 13; Altwegg-Boussac et coll., 2014; Bruno et Sakmann, 2006; Mahon et coll., 2001). De façon similaire à ce que l’on peut observer pendant l’éveil actif, les neurones corticaux sont caractérisés par une activité de décharge relativement soutenue, un potentiel de membrane dépolarisé et des fluctuations synaptiques de faible amplitude (Fig. 13) conduisant à une distribution unimodale du potentiel transmembranaire (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Constantinople et Bruno, 2011; Mahon et coll., 2001).

L’anesthésie à la kétamine/xylazine est généralement utilisée pour mimer les activités du sommeil à ondes lentes (Contreras et Steriade, 1995; Mahon et coll., 2001, 2006; Rudolph et coll., 2005). Les neurones corticaux enregistrés lors de cette anesthésie ont un potentiel de membrane à la distribution bimodale reflétant une alternance d’états « hauts » dépolarisés et « bas » plus hyperpolarisés durant lesquels l’activité synaptique est interrompue (Chauvette et coll., 2011).

1.2.2 Les comas

1.2.2.1 Définition et étiologies

Un patient en état de coma est inactif, les yeux fermés et ne peut être réveillé. Il peut grimacer, avoir des réponses réflexives à la douleur ou encore bouger de manière stéréotypée, il ne présente cependant aucune réponse comportementale appropriée à des stimuli environnementaux d'intensité et de nature variable (Brown et coll., 2010). L'état de coma peut résulter de dommages directs subis au niveau des noyaux pontins et de leur voies ascendantes dans le mésencéphale (Parvizi et Damasio, 2003) mais peut être aussi une conséquence d'altérations plus diffuses affectant tout le cerveau (James et coll., 2014; Kaplan, 2004). Ainsi, les encéphalopathies d'origine métaboliques liées à un dysfonctionnement hépatique ou rénal sont parmi les premières causes de coma (Hughes, 1980; Kaplan, 2004). La prise de doses massives de substances dépressives du système nerveux central comme les benzodiazépines ou les barbituriques peut entraîner une perte de conscience et un état de coma (DeRubeis et Young, 2001; Weissenborn et coll., 1991). Finalement, une privation de l'apport en oxygène (O₂) au cerveau, liée par exemple à un arrêt cardiorespiratoire représente la cause de coma au pronostic clinique le plus défavorable (Brenner et Schaul, 1990; Husain, 2006). En contexte clinique l'évaluation de l'état de coma et de sa profondeur est majoritairement réalisée au chevet des patients et quantifiée grâce à l'échelle de Glasgow sur la base des réponses motrices, verbales et oculomotrices (Teasdale et Jennett, 1974). Dans certains cas, un suivi des activités EEG est réalisé en complément et l'enregistrement de certains patrons d'activité permet d'évaluer la sévérité des atteintes cérébrales ou la profondeur du coma (Husain, 2006) lorsque son étiologie est connue (Brenner, 2005). Ainsi, un coma peut être associé à une activité EEG présentant des oscillations généralisées anormales dont la fréquence diminue avec la profondeur du coma (Husain, 2006). Lors d'états de coma avancés, on peut observer une déstructuration de l'activité électrique de fond, qui se traduit par la survenue plus ou moins périodique de motifs EEG anormaux ou encore une abolition complète de l'activité électrique de surface (Kroeger et coll., 2013; Kuroiwa et Celesia, 1980; Niedermeyer et coll., 1999).

1.2.2.2 Généralisation d'activités oscillatoires

1.2.2.2.1 Les comas à ondes delta

Résultant typiquement de lésions cérébrales atteignant les fibres sous-corticales ou d'encéphalopathies métaboliques, ce coma est associé à un EEG dominé par des ondes delta (1 – 4 Hz) survenant de façon continue (Fig. 14A; Chatrian et coll., 1963; Kaplan, 2004). Ces activités delta sont généralisées à l'ensemble des aires corticales lors d'encéphalopathies métaboliques diffuses, par exemple d'origine rénale (O'Hare et coll., 1983). Les ondes delta resteront, par contre, focales lors d'un état de coma résultant de lésions sous-corticales focales (Brenner, 2005). Une augmentation de la profondeur du coma entraîne un ralentissement des oscillations EEG et une diminution de la réactivité des sujets aux stimulations sensorielles (Husain, 2006). Ainsi, Moulton et ses collaborateurs (1998) ont montré une corrélation inverse entre l'amplitude des potentiels évoqués somesthésiques et l'évolution pronostique chez des patients en état de coma delta à la suite de violents traumatismes crâniens associés à des lésions (échelle de Glasgow ≤ 8). La perte des potentiels évoqués somesthésiques étant souvent associée à un très mauvais pronostic (Moulton et coll., 1998).

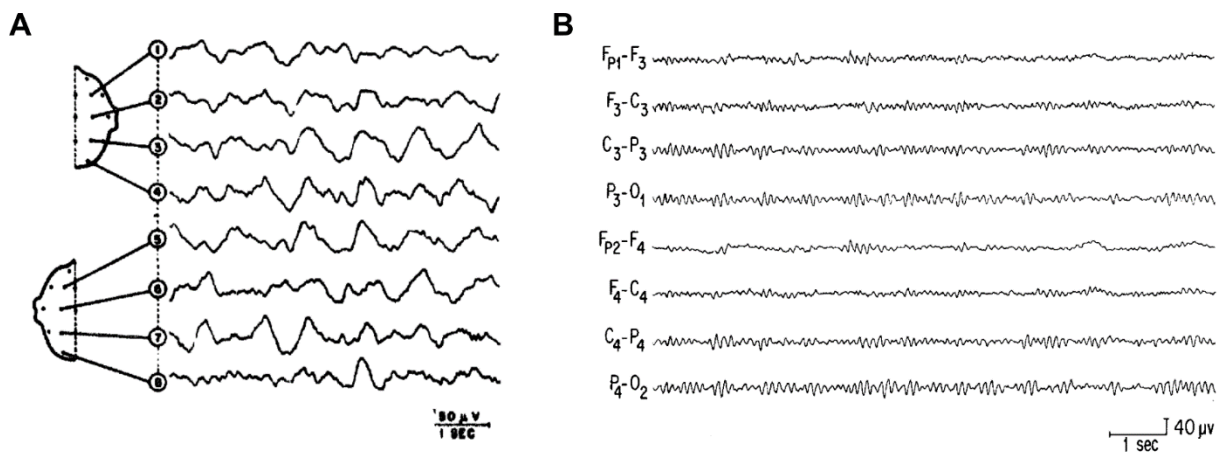


Figure 14 : Généralisation d'activités oscillatoire lors des états de coma. A, Activités continues de la bande delta enregistrées chez un patient une journée après un violent traumatisme crânien. Noter que les activités sont enregistrées dans les deux hémisphères. **B,** Oscillations de la bande alpha généralisées chez une patiente victime d'un infarctus au niveau du tronc cérébral. A, adapté de Chatrian et coll., 1963 ; B, adapté de Westmoreland et coll., 1975.

1.2.2.2.2 Les comas à ondes alpha

Le coma alpha est caractérisé par un EEG dominé par des activités à 8 – 13 Hz et peut être séparé en deux grands types selon son étiologie (Husain, 2006). Un arrêt cardiorespiratoire peut entraîner un coma alpha caractérisé par une généralisation des ondes alpha à toutes les aires corticales avec une légère prédominance dans les régions frontales (Fig. 14B; Alving et coll., 1979). Les stimulations nociceptives n'entraînent pas de modification du contenu spectral de l'activité corticale ou de la morphologie des potentiels électriques (Kaplan et coll., 1999; Westmoreland et coll., 1975). Le taux de mortalité de ces patients dépasse souvent les 90% (Kaplan et coll., 1999; Young et coll., 1994). Une intoxication aux barbituriques ou aux benzodiazépines peut également entraîner des comas alpha (Carroll et Mastaglia, 1979; Guterman et coll., 1981). Dans ce cas les oscillations généralisées sont entrecoupées de courtes périodes d'activité plus rapides entre 13 et 15 Hz, lesquelles s'allongent avec la sortie progressive de l'état de coma (Carroll et Mastaglia, 1979). Ces patients sont réactifs aux stimulations auditives et nociceptives et récupèrent une activité spontanée physiologique dans 90% des cas (Carroll et Mastaglia, 1979; Guterman et coll., 1981; Husain, 2006). De manière générale le pronostic clinique de sortie du coma alpha dépend de son étiologie et de la capacité du cerveau à intégrer les informations périphériques (Kaplan et coll., 1999).

1.2.2.3 Activités EEG déstructurées

1.2.2.3.1 Les activités périodiques

Les « activités périodiques » regroupent un ensemble hétérogène d'activités EEG altérées aux étiologies multiples qui surviennent de façon plus ou moins régulières (Kuroiwa et Celesia, 1980). Elles peuvent survenir suite à des lésions focales ou étendues, des encéphalopathies métaboliques ou anoxiques, des intoxications médicamenteuses, des encéphalites herpétiques ou encore des états de mal épileptiques (Amodio et Montagnese, 2015; de la Paz et Brenner, 1981; Snodgrass et coll., 1989). Elles sont classifiées d'après la morphologie des ondes, leur cohérence spatio-temporelle et leur fréquence de récurrence (Brenner et Schaul, 1990). On distingue alors les décharges épileptiformes périodiques latéralisées (PLEDs ; Fig. 15A) et leur homologue bilatéral asynchrone (BIPLÉDs ; Fig. 15A) qui surviennent à une fréquence de 0,25 à 2Hz, des décharges triphasiques diffuses à courte et longue période (PSIDDs et PLIDDs ; Fig. 15B) qui, elles, sont bilatérales et dont les fréquences de récurrence sont respectivement 0,25 – 2 Hz et 0,03 – 0,25 Hz (Brenner et Schaul, 1990; Kuroiwa et Celesia, 1980). Peu d'informations sont disponibles quant aux corrélats neuronaux

des décharges périodiques mais Gloor et ses collaborateurs ont suggéré que ces activités sont générées au sein de structures sous-corticales avant leur éventuelle généralisation (Gloor et coll., 1968). L'étendue des aires corticales impliquées et la fréquence de survenue de ces activités peuvent, dans certains cas, renseigner la gravité des atteintes cérébrales (Fitzpatrick et Lowry, 2007; de la Paz et Brenner, 1981). Le pronostic clinique des patients présentant des activités périodiques est éminemment dépendant de l'étiologie mais généralement peu favorable avec des taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 91 % lors de comas post-anoxiques (Renzel et coll., 2017; Willems et coll., 2021).

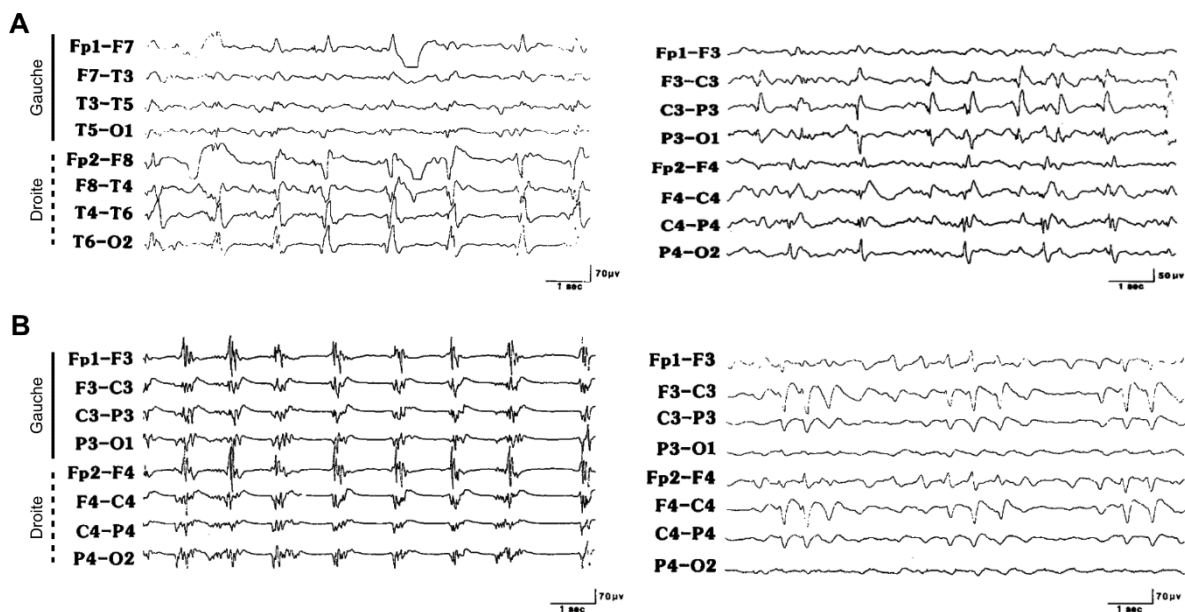


Figure 15 : Déstructuration des activités EEG lors des comas. A, PLEDs (gauche) et BIPLEDs (droite) enregistrées respectivement chez des patients en état de coma aux suites d'un état de mal épileptique latéralisé (gauche) et d'un infarctus des deux hémisphères cérébraux (droite). Noter que les PLEDs n'apparaissent que dans l'hémisphère droit alors que les BIPLEDs sont généralisées mais asynchrones. **B,** PSIDDs généralisées enregistrées respectivement chez un patient victime d'anoxie cérébrale (gauche) et d'encéphalopathie d'origine hépatique (droite). Noter la différence dans l'aspect des décharges périodiques qui peuvent être des grapho-éléments de type « poly-pointes » (gauche) ou des ondes triphasiques (droite). Adapté de Brenner et Schaul, 1990.

1.2.2.3.2 Le profil EEG de type « Burst-Suppression »

Le patron EEG de type Burst-Suppression (B-S) est considéré comme un des plus critiques (Husain, 2006). Pour la première fois observé en 1949 par Swank et Watson chez le chien et le singe après injection d'un bolus d'amytal sodium, un potentialisateur de la transmission GABAergique (Swank et Watson, 1949), son premier enregistrement chez l'humain est attribué à Henry et Scoville qui ont, en 1952, enregistré un profil B-S à la surface

de parties de cortex isolées par lobotomie chez des patients schizophrènes (Fig. 16D; Henry et Scoville, 1952).

L'EEG de type B-S peut faire suite à une anesthésie générale induite par des molécules comme les barbituriques, le propofol ou les éthers halogénés (Illievich et coll., 1993; Kroeger et Amzica, 2007; Rampil et coll., 1991) auxquels cas l'état cérébral des sujets est totalement réversible (Fig. 16A). Certaines formes rares d'encéphalopathies épileptiques infantiles, comme le *syndrome d'Ohtahara* peuvent mener à l'enregistrement d'un tracé B-S, qui se superpose aux crises épileptiques (Yamatogi et Ohtahara, 2002). Lors de très sévères anoxies cérébrales, des activités de type B-S surviennent avant l'établissement d'une période de silence électro-cérébral prolongée (Fig. 16C; Hughes et coll., 1976). Le pronostic des patients en coma B-S post-anoxique est très mauvais, avec presque 100% de mortalité (Hughes et coll., 1976; Kuroiwa et Celesia, 1980).

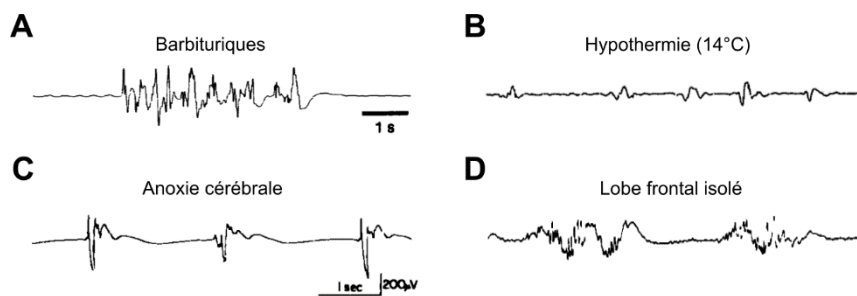


Figure 16 : Le patron B-S et ses différentes étiologies. **A**, Période de burst complexe encadrée par des périodes d'EEG silencieux enregistrée chez le chat anesthésié aux barbituriques (40 mg/kg) au niveau du gyrus suprasylvien. **B**, Etat B-S enregistré chez le chien après réduction de la température épidurale à 14°C par injection intraveineuse de saline refroidie. Noter que les périodes de bursts ne consistent qu'en un seul potentiel négatif puis positif. **C**, Patron EEG B-S enregistré chez un patient victime d'anoxie cérébrale consécutive à un arrêt cardiorespiratoire. **D**, Signal EEG d'une partie de cortex isolée par lobotomie chez un patient schizophrène préalablement anesthésié au penthotal. A, adapté de (Steriade et coll., 1994) ; B, adapté de (Michenfelder et Milde, 1991) ; C, adapté de (Niedermeyer et coll., 1999) ; D, modifié de (Henry and Scoville, 1952).

Des patrons EEG B-S réversibles ont aussi été enregistrés lors d'hypothermies profondes (température rhino-pharyngienne à 24°C) à but neuroprotecteur (Stecker et coll., 2001) ou lors d'expériences chez le chien et le rat dont la température interne était inférieure à 20°C (Fig. 16B; Michenfelder et Milde, 1991; Nakashima et coll., 1995). Des comas B-S ont été rapportés après l'ingestion de fortes doses de benzodiazépines (DeRubeis et Young, 2001) ou de myorelaxants (Weissenborn et coll., 1991). Dans ces cas, les patients ont récupéré une activité cérébrale de fond physiologique et ne présentaient pas de séquelles neurologiques notables hormis une amnésie rétrograde. Le pronostic clinique des patients présentant un patron

EEG de type B-S est donc essentiellement lié à son étiologie (Husain, 2006), de très bon, lors d'une anesthésie générale ou une hypothermie, à une très forte mortalité lors d'une anoxie cérébrale (Niedermeyer et coll., 1999).

Selon la définition donnée par la *Fédération des Sociétés pour l'Electroencéphalographie et la Neurophysiologie Clinique* (IFSECN), le profil de type B-S est caractérisé par la « généralisation à toutes les aires corticales d'activités de fréquence se situant dans les bandes thêta et/ou delta se superposant à des périodes de relative quiescence électrique » (Chatrian et coll., 1974). Cette définition a plus tard fait l'objet de critiques, notamment car elle omettait de mentionner la nature poly-étiologique du profil B-S, ne préconisant l'utilisation du terme que dans le but de décrire les effets des molécules anesthésiantes sur l'activité EEG de fond (Chatrian et coll., 1974; Niedermeyer et coll., 1999). Une autre critique peut être émise sur son manque d'exhaustivité quant à la diversité apparente des activités observées durant les périodes de bursts car des grapho-éléments de type « pointes » ou « polypointes » peuvent se superposer aux activités thêta/delta (Niedermeyer et coll., 1999). L'état B-S est donc caractérisé à l'EEG par des périodes de silence électrique entrecoupées de bouffées d'activité corrélées à d'amples potentiel postsynaptiques dépolarisants dans les neurones corticaux sous-jacents (Amzica, 2015; Lukatch et coll., 2005; Steriade et coll., 1994). Une étude chez le chat anesthésié aux barbituriques réalisée par Steriade et ses collaborateurs (1994) a pu montrer qu'une partie (40 à 50 %) des neurones thalamiques déchargeaient de manière rythmique (1 – 4 Hz) durant les périodes de silence enregistrées dans l'EEG alors qu'aucune activité synaptique n'était enregistrées dans les neurones corticaux (Steriade et coll., 1994). Cette absence de corrélation entre les structures corticales et sous-corticales mise en correspondance avec la subsistance du patron B-S en cortex isolé amène à considérer celui-ci comme résultant d'une déconnexion structurelle (déafférentation) ou fonctionnelle (suppression des entrées excitatrices sous-corticales) des réseaux corticaux de leurs afférences sous-corticales (Henry et Scoville, 1952; Steriade et coll., 1994). La profondeur de l'état de coma et donc la potentielle étendue des dommages cérébraux sont étroitement corrélées à la durée des périodes de bursts et à leur fréquence d'apparition sur les tracés EEG (Husain, 2006). Avec l'approfondissement du coma, les bursts s'estompent ne laissant alors qu'un tracé plat ou isoélectrique.

1.3 Les états isoélectriques

1.3.1 Définitions cliniques et neurophysiologiques

Un état isoélectrique, parfois nommé silence électro-cérébral ou bien encore inactivité électro-cérébrale, est un état cérébral caractérisé par un EEG dénué de variations de potentiel d'origine synaptique. En clinique, un EEG est généralement qualifié d'isoélectrique lorsque l'amplitude des fluctuations de potentiel observées ne dépasse pas 2 à 10 μV (André-Obadia et coll., 2014; Husain, 2006; Young, 2000). Le silence électro-cérébral peut être enregistré dans des conditions physiologiques comme l'hibernation (Harding et coll., 2019) et le sommeil (états « bas » ; Timofeev et coll., 2001) ou dans des conditions pathologiques détaillées plus bas, auxquels cas, il est associé à un état de coma. Le silence électro-cérébrale est pluri-étiologique. Il peut émerger après une période d'anoxie cérébrale prolongée (Hofmeijer et van Putten, 2016), d'une hypothermie « profonde » (Stecker et coll., 2001), d'une intoxication médicamenteuse (Altwegg-Boussac et coll., 2017; Kirshbaum et Carollo, 1970) ou encore d'une encéphalopathie métabolique (Kaplan, 2004; Trojaborg et Jorgensen, 1973). La gravité du coma isoélectrique est étiologie-dépendante, le spectre pronostic des patients allant d'un état transitoire et entièrement réversible, en l'absence de comorbidités, lors d'une intoxication médicamenteuse ou d'une hypothermie (Altwegg-Boussac et coll., 2017; Kirshbaum et Carollo, 1970; Stecker et coll., 2001) jusqu'à un état végétatif irréversible ou la mort encéphalique dans le cas d'encéphalopathie gravissimes, de trauma crânien dévastateur ou d'anoxie cérébrale de longue durée (Carlson et coll., 2019; Hofmeijer et van Putten, 2016; Kaplan, 2004). L'EEG isoélectrique reflète une abolition de l'activité synaptique spontanée dans les neurones corticaux et sous-corticaux enregistrés (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2016, 2017; Kroeger et Amzica, 2007) et était, jusqu'à récemment, généralement considéré comme le reflet d'une abolition de l'excitabilité neuronale et des processus d'intégration sensorielle (André-Obadia et coll., 2014; Husain, 2006; Kroeger et Amzica, 2007).

1.3.2 L'état isoélectrique induit par les barbituriques

1.3.2.1 Mécanismes d'action des barbituriques : aspects cellulaires et dose-dépendance

Les molécules de la famille des barbituriques comme le thiopental ou le pentobarbital sont des potentialisateurs de la transmission GABAergique mais qui, à forte dose, peuvent avoir un impact sur les mécanismes de libération de neurotransmetteurs et la fonction d'autres conductances postsynaptiques ou intrinsèques (Richards, 2002; Rudolph et Antkowiak, 2004).

Les barbituriques sont des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A. Leur fixation à la sous-unité α des récepteurs renforce l'affinité de ceux-ci avec le GABA et augmente le temps d'ouverture des canaux (Harris et coll., 1995; Krasowski et Harrison, 1999; Richards, 2002), ce qui se traduit par une nette augmentation dose-dépendante de l'amplitude et de la durée des courants et potentiels postsynaptiques inhibiteurs (Fig. 17; MacIver et coll., 1991; Mathers et coll., 2007; Zimmerman et coll., 1994). A forte doses, les molécules barbituriques, telles que le pentobarbital, peuvent activer directement les récepteurs GABA_A en l'absence d'agoniste, se fixant alors sur la sous-unité β des récepteurs (Akk et Steinbach, 2000; Harris et coll., 1995). La transmission excitatrice peut également être affectée par les barbituriques, notamment les récepteurs NMDA dont la durée d'ouverture est inversement corrélée à la concentration de pentobarbital dans le milieu interstitiel (Charlesworth et coll., 1995).

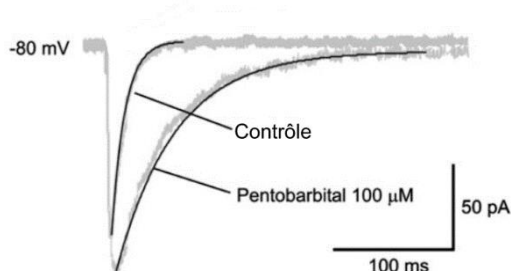


Figure 17 : Les barbituriques potentialisent la transmission synaptique GABAergique. Par leur fixation sur les récepteurs GABA_A et les modifications conformationnelles en résultant, les molécules barbituriques augmentent l'amplitude et la durée des courants postsynaptiques inhibiteurs. Adapté de Mathers et coll., 2007.

Il semblerait que les barbituriques puissent aussi agir au niveau de l'élément présynaptique puisqu'une étude *in vitro* a montré une augmentation de libération de GABA après une stimulation électrique directe en présence de pentobarbital au sein du cortex piriforme

chez le rat (Collins, 1980). Les mécanismes de cette potentialisation restent à déterminer puisque les barbituriques ne modifient pas les propriétés de propagation des PAs au sein des axones et auraient plutôt tendance à diminuer légèrement l'influx calcique associé à cette propagation des PAs au niveau des terminaisons axonales (Baudoux et coll., 2003).

Des expériences menées *in vitro* sur les neurones du noyau ventro-basal du thalamus chez le rat ont révélé que l'application de pentobarbital dans le milieu extracellulaire potentialisait le courant potassique « de fuite » ainsi que le courant potassique de la rectification entrante I_{Kir} tout en inhibant le courant I_H (voir chapitre 1.1.2.2.2; Wan et coll., 2003).

1.3.2.2 Mécanismes d'induction de l'état isoélectrique

Des états isoélectriques induits par un surdosage de barbituriques ont été décrits chez le chien (Swank et Watson, 1949) et le rat (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2016, 2017). Chez l'homme, cet état s'observe chez des patients présentant un état de mal épileptique hyper-réfractaire après l'injection de très fortes doses destinées à arrêter les crises (Altwegg-Boussac et coll., 2017; Claassen et coll., 2002; Dan et Boyd, 2006) mais également après une intoxication médicamenteuse (Kirshbaum et Carollo, 1970). Des études menées par Altwegg-Boussac et ses collaborateurs sur le rat *in vivo* ont montré que l'injection d'un bolus (~75 mg/kg) de pentobarbital entraînait tout d'abord le développement d'un patron EEG de type fuseaux du sommeil qui était rapidement remplacé par un EEG B-S dont les périodes de suppression s'allongeaient progressivement jusqu'à l'établissement d'un tracé isoélectrique (Altwegg-Boussac et coll., 2016, 2017). L'état isoélectrique induit par les barbituriques était associé à une abolition de la décharge de PAs et des fluctuations synaptiques dans les neurones corticaux, hippocampiques et thalamiques (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017).

L'augmentation de l'inhibition par potentialisation de la transmission GABAergique dans le thalamus (Brown et coll., 2011; Rudolph et Antkowiak, 2004) conduit dans un premier temps au renforcement des relations synaptiques réciproques entre le nRT et noyaux de relai thalamo-corticaux et l'activation de leurs propriétés intrinsèques spécifiques, permettant l'émergence d'un patron d'activités de type fuseaux de sommeil au niveau cortical (voir chapitre 1.1.2.2.1 ; chapitre 1.2.1.2).

Une activité inhibitrice renforcée au sein des réseaux thalamiques et corticaux (Mathers et coll., 2007; Wan et coll., 2003) combinée à l'activation directe des conductances $GABA_A$ par les barbituriques (Akk et Steinbach, 2000) seront ensuite responsables d'une suppression

intermittente de la décharge dans les neurones pyramidaux excitateurs, conduisant à l'émergence d'un patron EEG de type B-S (Altwegg-Boussac et coll., 2017). La réduction du temps d'ouverture des récepteurs NMDA diminuant l'efficacité des transmissions excitatrices (Charlesworth et coll., 1995), ainsi que la potentialisation des courants potassiques hyperpolarisants et l'inhibition des courants I_H (Wan et coll., 2003), accentuent ces effets qui *in fine* résultent en une mise au silence des neurones corticaux excitateurs, puis inhibiteurs, et en l'obtention d'un tracé EEG isoélectrique continu (Altwegg-Boussac et coll., 2017).

1.3.2.3 Impact sur l'excitabilité cellulaire et l'intégration sensorielle

L'arrêt des fluctuations synaptiques spontanées et de l'activité de décharge dans les neurones corticaux, thalamiques et hippocampiques, est associée à une hyperpolarisation de leur potentiel membranaire de 5 à 10 mV (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017). Une telle diminution de la conductance synaptique membranaire pendant l'état isoélectrique devrait être à l'origine d'une augmentation significative de la résistance d'entrée et de la constante de temps membranaire des neurones (Destexhe et coll., 2003) mais les mesures réalisées au niveau somatique dans les différents types neuronaux indiquent une stabilité de ces paramètres (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Wan et coll., 2003). Il est ainsi proposé que la potentialisation de certaines conductances potassiques « intrinsèques » par les barbituriques puisse compenser la diminution de conductance synaptique (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017; Waters et Helmchen, 2006). Ces études ont également mis en évidence que l'hyperpolarisation du potentiel transmembranaire des neurones corticaux, associée à une stabilité de leurs propriétés membranaires passives, conduisait à un glissement vers la droite de leur relation entrée-sortie sans modification de la pente de cette relation (Fig. 18A, B; Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017). Ces résultats indiquent que la suppression de l'activité synaptique n'abolit pas l'excitabilité des neurones corticaux mais accroît l'intensité du stimulus excitateur qu'il sera nécessaire d'appliquer pour induire leur décharge. L'arrêt des activités spontanées induisait également un accroissement considérable de la fiabilité temporelle des réponses évoquées par des stimulations directes dépolarisantes (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017).

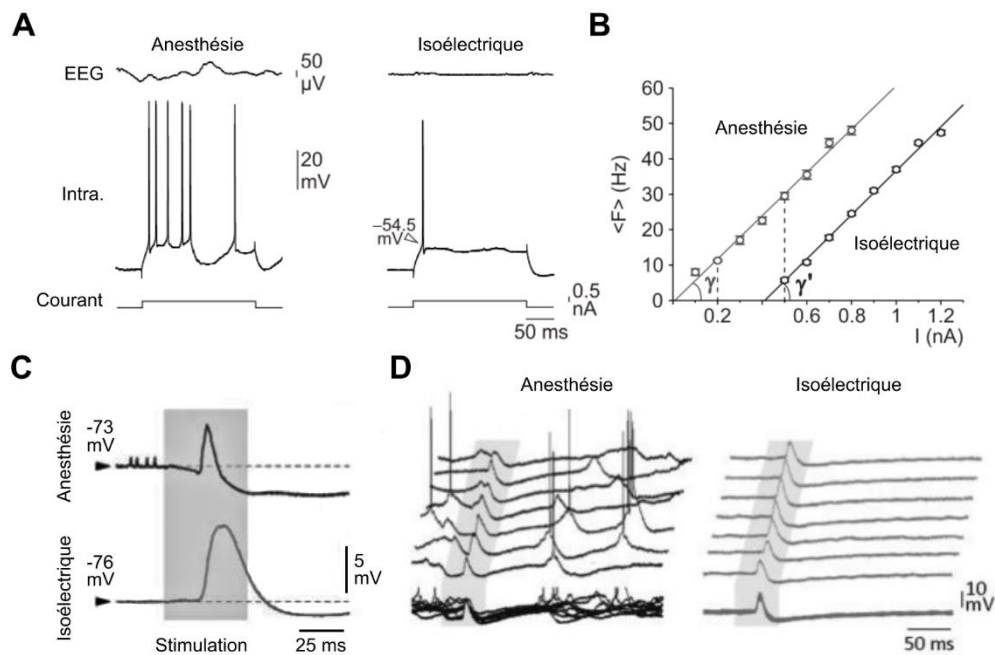


Figure 18 : L'impact de l'induction d'un état isoélectrique par les barbituriques sur les propriétés d'excitabilité et d'intégration sensorielle des neurones corticaux. **A**, L'augmentation des doses de pentobarbital de 10 – 15 à 100 mg/kg entraîne une diminution, dans les neurones corticaux, du nombre de PAs déclenchés (Intra.) par un échelon de courant dépolarisant de 0,5 nA (trace du bas). **B**, Lors de l'état isoélectrique la relation entrée-sortie des neurones corticaux est translatée vers la droite, les neurones corticaux sont moins sensibles aux courants dépolarisants. **C**, Les potentiels postsynaptiques déclenchés par la déflexion des vibrisses sont plus amples dans l'état isoélectrique que dans l'état contrôle. **D**, Lors de l'état isoélectrique, les neurones corticaux perdent toute variabilité dans la latence et amplitude des réponses synaptiques déclenchés par des stimulations sensorielles. A,B adaptés de Altwegg-Boussac et coll., 2014 ; C,D adaptés de Altwegg-Boussac et coll., 2017.

Les résultats des différentes études consacrées à l'analyse des réponses sensorielles évoquées au cours d'un état isoélectrique induit par les barbituriques restent controversés. Chez le rat surdosé en barbituriques, des travaux ont mis en évidence que les potentiels synaptiques évoqués dans les neurones corticaux par des stimulations sensorielles non seulement persistaient au cours de l'état isoélectrique mais présentaient une amplitude accrue lorsque comparée à la situation contrôle (Fig. 18C; Altwegg-Boussac et coll., 2017). Il est probable que cet accroissement de l'amplitude des réponses sensorielles résulte d'une augmentation de la force électromotrice des courants excitateurs due à l'hyperpolarisation des neurones corticaux (Altwegg-Boussac et coll., 2017). L'amplification des réponses sensorielles était accompagnée d'une augmentation de leur latence de survenue, une diminution de leur probabilité de déclencher des PAs et une réduction marquée de leur variabilité (Fig. 18C, D). Ces modifications des réponses sensorielles étaient retrouvées chez les patients épileptiques traités à l'aide de fortes doses de barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2017).

L'induction d'un état isoélectrique par les barbituriques n'est donc pas associée à une abolition de l'excitabilité cellulaire. Les neurones et réseaux isoélectriques sont encore capables d'intégrer et de propager des informations périphériques dans un état « quiescent », inactif mais activable.

1.3.3 L'état isoélectrique induit par les éthers halogénés

1.3.3.1 Les différents composés

Depuis leur découverte et démocratisation durant le 19^{ème} siècle (Caton, 2000; Fenster, 2001), les espèces anesthésiantes volatiles ont été utilisées en contexte clinique afin d'induire la perte de conscience lors d'opérations douloureuses ou gênantes (Campagna et coll., 2003). Dans un premier temps, les praticiens favorisaient l'utilisation d'éther diéthylique pour induire l'anesthésie des patients jusqu'à ce que sa propriété inflammable, voire explosive, ne fut accidentellement découverte (Fenster, 2001), forçant alors les médecins à se tourner vers les hydrocarbures halogénés comme l'halothane ou le chloroforme (Featherstone, 1947; Meyer et Allen, 1967) qui, bien que n'étant pas inflammable, peuvent être la cause de pathologies rénales, hépatiques ou neurologiques pour des périodes d'exposition prolongées (Gelman et Lichtenstein, 1981; Levin et coll., 1991). Dans le contexte clinique actuel l'anesthésie gazeuse est essentiellement induite par les éthers halogénés.

Les éthers sont une grande famille de composés organiques avec la particularité de contenir un ou plusieurs groupes éthers, un atome d'oxygène relié à deux groupes alkyles. Un éther est dit halogéné lorsque qu'un ou plusieurs atomes d'hydrogène ont été substitués par un atome de la famille des halogènes : fluor, brome, chlore ou encore iode. On compte dans le sous-groupe des éthers halogénés des substances telles que le sevoflurane et le desflurane communément utilisées en anesthésie humaine (Olthoff et Rohrbach, 1998; Purdon et coll., 2015) ou encore l'isoflurane et son isomère, l'enflurane, omniprésents dans les cliniques vétérinaires et laboratoires d'expérimentation animale (White et coll., 1974). Pour quantifier la puissance anesthésiante des molécules volatiles et donc la lier à des effets comportementaux pertinents pour les praticiens, l'échelle la plus utilisée est la concentration alvéolaire minimale nécessaire à l'abolition des réflexes à des stimulations douloureuses ou MAC (Campagna et coll., 2003; Merkel et Eger, 1963).

1.3.3.2 Mécanismes d'action des éthers halogénés : aspects cellulaires et dose-dépendance

Initialement classifiés comme simples potentialisateurs des transmissions GABAergiques de type A (Brown et coll., 2011), les cibles moléculaires des éthers halogénés semblent finalement être plus largement distribuées et avoir une action non-spécifique sur une variété de canaux ioniques exprimés à la synapse ou au niveau du soma des neurones (Campagna et coll., 2003; Krasowski et Harrison, 1999).

1.3.3.2.1 Actions présynaptiques des éthers halogénés

La présence d'éther halogéné comme l'isoflurane dans le milieu extracellulaire entraîne, au niveau de l'élément présynaptique, une diminution de la libération de neurotransmetteurs (Wu et coll., 2004). Celle-ci serait liée à un effet inhibiteur sur les canaux sodiques axonaux $Na_v 1.2$ (Herold et Hemmings, 2012), ce qui ralentirait la conduction axonale des PAs ainsi qu'en diminuerait la pente et l'amplitude (Fig. 19A; Berg-Johnsen et Langmoen, 1986; Wu et coll., 2004), induisant une diminution de l'entrée de calcium dans la terminaison axonale (Fig. 19B; Baumgart et coll., 2015; MacIver et coll., 1996). L'inhibition de libération de neurotransmetteurs est positivement corrélée avec la concentration d'isoflurane présente dans le milieu extracellulaire (Fig. 19C; Baumgart et coll., 2015; Berg-Johnsen et Langmoen, 1986; Wu et coll., 2004) et semble être neurotransmetteur-spécifique. Ainsi, l'augmentation des doses d'isoflurane dans un milieu de culture entraîne une plus forte inhibition de la libération de glutamate que de GABA, noradrénaline, acétylcholine ou dopamine (Fig. 19C; Westphalen et coll., 2013). Cette apparente spécificité peut être une conséquence de l'expression hétérogène des différentes isoformes de canaux ioniques et/ou des protéines régulant l'exocytose (Bragina et coll., 2012; Reid et coll., 2003).

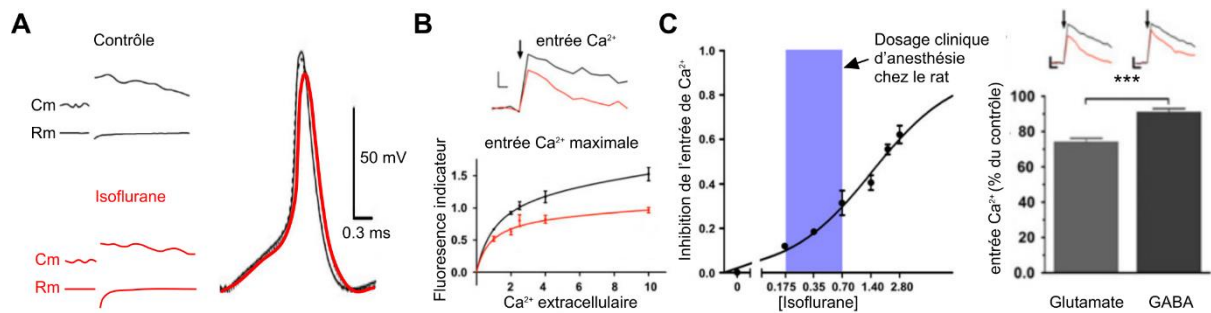


Figure 19 : Les effets présynaptiques des éthers halogénés. A, L'application d'isoflurane dans le milieu d'incubation entraîne, au niveau du calyx de Held chez le rat *in vitro*, une déformation du PA présynaptique (droite) et une diminution du saut de capacitance membranaire typique de la libération de vésicules par l'élément présynaptique (gauche). B, L'entrée de calcium dans l'élément présynaptique permettant la libération de neurotransmetteurs est fortement diminuée en présence d'isoflurane (traces du haut) dans l'hippocampe de rat, *in vitro*. De plus, l'entrée maximale de calcium dans l'élément présynaptique enregistrée via fluorescence est atténuée. C, L'inhibition de l'entrée de calcium dans l'élément présynaptique par l'isoflurane est dose-dépendante (graphe de gauche) et semble être plus importante au niveau des synapses glutamatergiques (graphe de droite). A, adapté de Wu et coll., 2004 ; B,C adaptés de Baumgart et coll., 2015.

1.3.3.2.2 Actions postsynaptiques des éthers halogénés

Les éthers halogénés sont des modulateurs allostériques positifs de l'action des agonistes sur les récepteurs-canaux GABAergiques et glycinergiques (Campagna et coll., 2003; Krasowski et Harrison, 1999). La molécule volatile, se fixant au niveau de la sous-unité α , ubiquitaire des récepteurs GABA_A et glycinergiques, entraîne une modification conformationnelle des récepteurs, augmentant leur affinité pour leur agoniste respectif (Mihic et coll., 1997). Il est à noter qu'une surdose d'éther halogénés, notamment d'isoflurane, peut entraîner une ouverture des récepteurs en l'absence d'agoniste (Downie et coll., 1996). Cette apparente augmentation dose-dépendante de la sensibilité des récepteurs perméables au chlore a pour conséquence une nette augmentation de l'amplitude et de la durée des courants postsynaptiques inhibiteurs (Gyulai et coll., 2001; Harrison et coll., 1993; Jones et Harrison, 1993). L'observation de cette potentialisation des courants inhibiteurs dans le système nerveux central et périphérique suggère un rôle important de celle-ci dans l'immobilité des sujets lors d'anesthésie induite par les éthers halogénés (Gyulai et coll., 2001; Harrison et coll., 1993). Cette action potentialisatrice de la transmission inhibitrice ne peut cependant pas expliquer à elle seule l'altération des activités neuronales observée lors d'une anesthésie aux éthers halogénés.

L'application d'éthers halogénés dans le milieu extracellulaire provoque une nette dépression dose-dépendante des potentiels postsynaptiques excitateurs induits par stimulation

électrique (Fig. 20A; El-Beheiry et Puil, 1989a) et des courant postsynaptiques induits par application des agonistes des récepteurs AMPA, NDMA et kainate (Fig. 20B; Lin et coll., 1993). Plutôt que d'une répercussion de la potentialisation des transmission GABAergiques, cette réduction des courants excitateurs résulterait d'une inhibition directe des récepteurs (Cheng et Kendig, 2000), par la fixation des molécules d'éthers halogénés aux domaines transmembranaires, plus particulièrement la boucle cystéine commune à la plupart des récepteurs ionotropiques (Campagna et coll., 2003). Une étude réalisée sur des neurones hippocampiques de rat a également montré qu'à faibles doses, l'isoflurane diminue progressivement la fréquence d'ouverture des récepteurs NMDA et qu'il en diminue la durée d'ouverture à plus fortes doses (Yang and Zorumski, 1991). De plus, à des concentrations cliniquement pertinentes, l'isoflurane stimule la phosphorylation des transporteurs de glutamate synaptosomiques par la protéine kinase C, entraînant une augmentation de la recapture du glutamate présent dans la fente synaptique par l'élément présynaptique (Larsen et coll., 1997).

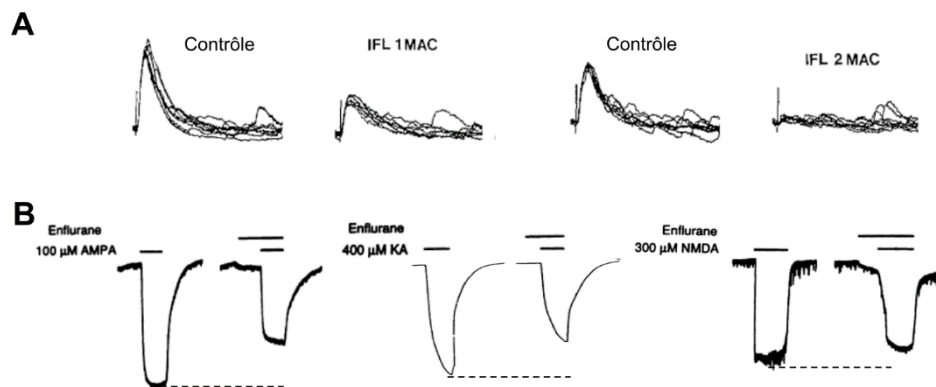


Figure 20 : Effet des éthers halogénés sur les récepteurs glutamatergiques. A, L'application d'isoflurane (IFL) dans le milieu d'incubation entraîne une dépression dose-dépendante des potentiels postsynaptiques dépolarisants déclenchés par stimulation électrique dans les neurones corticaux de cochons d'Inde *in vitro*. B, L'enflurane, isomère de l'isoflurane, diminue considérablement l'amplitude des courants issus de l'ouverture des récepteurs postsynaptiques après application de leur agonistes respectifs. A, adapté de El-Beheiry et Puil, 1989a ; B, adapté de Lin et coll., 1993.

Les éthers halogénés ont aussi une action indirecte inhibitrice sur les récepteurs métabotropiques, en augmentant l'activité de la protéine kinase C, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité des récepteurs muscariniques (Minami et coll., 1997). Enfin, une inhibition par les éthers halogénés des récepteurs à la sérotonine a également été démontrée, mais l'effet semble plus limité (Jenkins et coll., 1996; Yamakura et Harris, 2000).

1.3.3.2.3 Actions des éthers halogénés au niveau du soma

L'application de concentrations cliniques d'isoflurane dans une préparation *in vitro* d'hippocampe de souris diminue le seuil d'inactivation des courants sodiques, augmente la durée de leur période de dé-inactivation (Fig. 21A) et atténue l'amplitude des I_{NaP} de manière dose-dépendante (Fig. 21B), l'ensemble de ces altérations contribue à réduire l'excitabilité et la genèse des PAs dans les neurones hippocampiques (Zhao et coll., 2019).

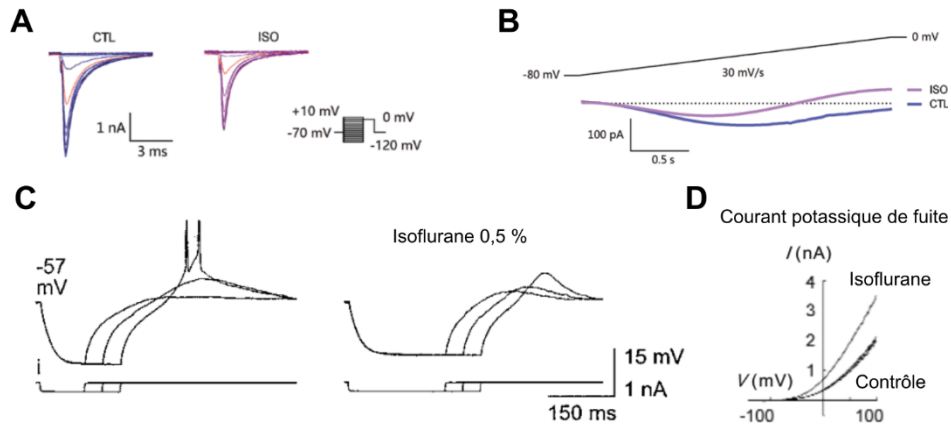


Figure 21 : Effets des éthers halogénés sur les canaux voltage-dépendants. A, Atténuation de l'amplitude des courants sodiques induits par des sauts de potentiels dans les neurones hippocampiques *in vitro*. Les traces rouges indiquent les courants induits par le même saut de potentiel en présence (ISO) ou absence (CTL) d'isoflurane. Cette baisse d'amplitude est synonyme d'une augmentation de la fraction de canaux sodiques inactivés pour une valeur de potentiel donnée. B, Diminution par l'isoflurane (ISO) de l'amplitude des I_{NaP} induits par augmentation graduelle (30 mV/s) du potentiel de membrane. C, Inhibition des courants calciques à bas seuil dans les neurones thalamiques par l'application d'isoflurane (0,5 %) dans le milieu d'incubation. La dépolarisation en « rebond » (trace de droite) pouvait tout de même être induite avec un échelon de courant (i) dépolarisant, mais seulement à la suite d'une augmentation préalable de la durée de l'hyperpolarisation. D, Augmentation de la pente de la relation courant-voltage des conductances potassiques de fuite après application d'isoflurane. L'isoflurane entraîne une activation des courants potassiques plus intense pour des valeurs de potentiel membranaires plus hyperpolarisées. A, B, modifiés d'après Zhao et coll., 2019 ; C, adapté d'après Ries et Puil, 1999 ; D, adapté d'après Patel et coll., 1999.

Les éthers halogénés sont aussi des modulateurs des conductances calciques voltage-dépendantes (Orestes et Todorovic, 2010). Des études réalisées *in vitro* sur des neurones de différents noyaux thalamiques ont montré une hyperpolarisation du seuil d'inactivation des courants I_T et un ralentissement de leur cinétique de retour d'inactivation, empêchant la décharge de « rebond » caractéristique de ces neurones (Fig. 21C; Eckle et coll., 2012; Ries et Puil, 1993, 1999; Timic Stamenic et coll., 2019).

Les conductances potassiques sont également altérées par les éthers halogénés (Franks et Lieb, 1994). El-Beheiry et Puil ont montré, dans les neurones pyramidaux de cochons d'Inde

in vitro, une diminution dose-dépendante de l'hyperpolarisation suivant la décharge (AHP) après application d'isoflurane, suggérant un effet de la molécule sur les canaux potassiques calcium-dépendants (El-Beheiry et Puil, 1989b). Dans des études réalisées *in vitro* sur des neurones du ganglion pariétal d'escargot, Franks et Lieb ont même identifié un courant potassique sortant qui semblait spécifiquement activé et modulé de façon dose-dépendante par les anesthésiques volatiles, (Franks et Lieb, 1988). Les propriétés d'activation et d'inactivation de ce courant semblent très similaires à celles du courant porté par les canaux potassiques de type deux pores (Honoré, 2007). Ce courant potassique sortant ou courant « de fuite » est impliqué dans le potentiel « de repos » des neurones enregistrés *in vitro* et est potentialisé directement par des doses croissantes d'éthers halogénés (Fig. 21D; Patel et coll., 1999; Yang et coll., 2020).

1.3.3.3 Mécanismes de l'induction de l'état isoélectrique par les éthers halogénés

Il a été montré chez le chat, le chien et l'humain que l'administration d'isoflurane à fortes doses (> 2,5% du volume inspiré) pouvait, à terme, provoquer la mise au silence des activités électriques spontanées dans l'EEG (Fig. 22; Eger et coll., 1971; Kroeger and Amzica, 2007; Kroeger et coll., 2013; Newberg et coll., 1983). Kroeger et Amzica (2007), dans leur étude chez le chat, ont pu montrer que l'EEG silencieux s'accompagnait d'une abolition de la décharge spontanée des neurones corticaux (Kroeger et Amzica, 2007). Bien que les mécanismes cellulaires des effets des éthers halogénés aient été amplement décrits, une description intégrée de l'induction du silence électro-cérébral par ces composés n'a pas encore été proposée. Dans le premier sous-chapitre de la discussion (voir chapitre 3.2.1), nous nous baserons sur les résultats obtenus lors de notre première étude (voir chapitre 2.1) pour proposer un modèle de la mise au silence des réseaux neuronaux par le surdosage d'isoflurane. Cependant les effets cellulaires accompagnant les différents dosages d'éthers halogénés peuvent nous renseigner sur les mécanismes de l'induction de l'état isoélectrique.

L'inhalation de doses anesthésiantes d'éthers halogénés (1 MAC ou 1% du volume inspiré) entraîne un ralentissement général des activités EEG. Au sein du thalamus, l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs limiterait la transmission cholinergique issue du tronc cérébral (Downie et coll., 1996; Westphalen et coll., 2013). La diminution d'acétylcholine dans

le thalamus entraînerait une hyperpolarisation des neurones thalamo-corticaux de relai (Steriade et coll., 1993a). Cette hyperpolarisation membranaire couplée à une potentialisation de la transmission GABAergique issue du nRT permettrait l'activation des conductances I_H puis I_T , conduisant au mode de décharge en burst des neurones thalamo-corticaux (voir chapitres 1.1.2.2.1 et 1.1.2.2.2). L'action des éthers halogénés sur les différentes structures cérébrales impliquées dans la genèse des rythmes cérébraux va finalement conduire à une synchronisation des réseaux corticaux et thalamiques donnant un patron EEG dominé par des ondes lentes entre 0,5 et 4 Hz similaires à celles enregistrées lors de périodes de sommeil profond (Fig. 22; Aksenov et coll., 2019; Purdon et coll., 2015; Steriade, 2006; Steriade et coll., 1993d).

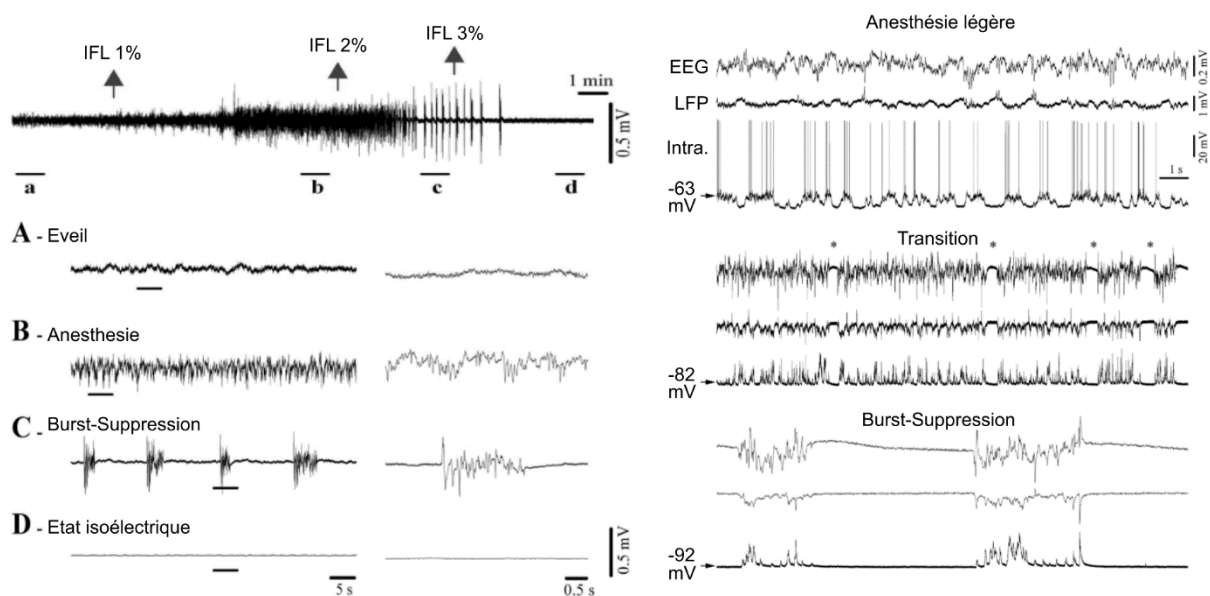


Figure 22 : Induction d'un état isoélectrique par les éthers halogénés. Panneau de gauche, Tracés EEG lors de l'induction de l'état isoélectrique chez le chat *in vivo*. Les traces du bas sont un élargissement des périodes renseignées sur l'enregistrement EEG du haut (a, b, c, d). Les signaux les plus à droite sont un élargissement des périodes soulignées sur l'enregistrement EEG de gauche. Panneau de droite, Passage d'un état anesthésié (isoflurane 1,5 %) à un état cérébral B-S par augmentation des doses d'isoflurane (2,5%) enregistré simultanément par EEG, potentiel de champ local (LFP) cortical et au sein d'une cellule pyramidale chez le chat *in vivo*. L'augmentation des doses d'isoflurane entraîne une hyperpolarisation du potentiel membranaire (Transition) et l'apparition de périodes de suppression (étoiles) dont la fréquence et la durée augmentent progressivement jusqu'à l'établissement d'un patron de type B-S (Burst-Suppression). Panneau de gauche adapté de Kroeger et coll., 2013 ; panneau de droite adapté de Ferron et coll., 2009.

Des doses d'anesthésiant volatile plus importantes (2 MAC ou 2% du volume inspiré) entraîne une déstructuration des patrons EEG, caractérisée par l'apparition de périodes de suppression d'activité qui viennent interrompre les oscillations lentes (Fig. 22). L'allongement progressif des périodes de suppression et le raccourcissement des périodes d'oscillations

conduit finalement à l'émergence d'un patron d'activité EEG de type B-S (Fig. 22; Amzica, 2015). Dans les neurones pyramidaux, l'état B-S se présente comme une succession de périodes de silence électrique caractérisées par une absence de potentiels postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs (Fig. 22; Ferron et coll., 2009; Steriade et coll., 1994) et des périodes de bursts pouvant être accompagnées d'une décharge de PAs (Fig. 22; Kroeger et Amzica, 2007; Steriade et coll., 1994).

L'administration de surdoses d'éthers halogénés (>2 MAC ou >2,5%) induit un allongement des périodes de suppression et une diminution de la fréquence de survenue des bursts (jusqu'à moins d'un burst par minute). Les périodes de bursts sont plus courtes et les fluctuations amples de potentiel les composant deviennent moins rapides jusqu'à disparaître totalement (Kroeger et coll., 2013). Le cerveau entre dans un état isoélectrique, à ce moment, aucune fluctuation de potentiel électrique n'est enregistrée à l'EEG. Les doses massives d'éthers halogénés requises pour induire cet état critique ont pour effet d'exacerber tous les effets de ces composés sur les compartiments pré et postsynaptiques des neurones amenant à une mise au silence des neurones corticaux et sous-corticaux (Eger et coll., 1971; Kroeger et coll., 2013).

Des travaux menés *in vivo* chez le chat, suggèrent que les stimulations sensorielles appliquées pendant l'état isoélectrique induit par l'isoflurane ne seraient pas capables d'évoquer de réponses synaptiques dans les neurones corticaux (Ferron et coll., 2009; Kroeger et Amzica, 2007). Cette absence de réponse était attribuée à l'augmentation de la concentration extracellulaire de potassium, notamment due à l'activité potentialisée des canaux potassiques « de fuite », qui diminuerait l'excitabilité des axones et abolirait donc la transmission des informations sensorielles au cortex (Ferron et coll., 2009; Kocsis et coll., 1983; Kroeger et Amzica, 2007).

1.3.4 L'hypothermie

Chez l'humain l'hypothermie est définie comme la réduction volontaire ou accidentelle de la température rectale ou nasopharyngée en dessous de 35 °C (Brown et coll., 2013). On distingue deux types d'hypothermie : l'hypothermie modérée (35 – 32 °C) et l'hypothermie profonde (< 32 °C) (Erecinska et coll., 2003). Le développement d'un EEG isoélectrique a été rapporté lors d'hypothermies profondes par des études menées sur des modèles animaux (Jia et coll., 2007; Michenfelder et Milde, 1991) et chez l'humain (Reilly, 1989; Stecker et coll., 2001). Lors d'un refroidissement général la température interne n'évolue pas de manière homogène,

la température cérébrale, en particulier, diminue de 0.21 °C par minute et ne descend que de ~ 9 °C (4°C de moins que la température rectale) lors de l'application d'alcool refroidie sur la peau chez le chat (Kiley et coll., 1984).

1.3.4.1 Mécanismes d'action de l'hypothermie : aspects cellulaires

De manière générale, l'hypothermie ralentit le métabolisme cérébral. En moyenne, chez les mammifères la consommation d'oxygène par le cerveau (voir chapitre 1.3.5.2.1) diminue linéairement de 50 à 75 % lors d'un refroidissement de 10 °C sous la température physiologique (Erecinska et coll., 2003; Michenfelder et Milde, 1991). Par ailleurs, les mesures de consommation de glucose dans le cortex, le cervelet et le corps calleux du rat indiquent que celle-ci est réduite d'environ 10 % /°C (Erecinska et coll., 2003; Frietsch et coll., 2000; Krafft et coll., 2000). Cette réduction des deux réactifs principaux de la chaîne respiratoire suggère une diminution de la production d'adénosine triphosphate (ATP).

Dans des préparations *in vitro*, la diminution de la température de la solution d'incubation sous la barre des 15 °C entraîne une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones hippocampiques et corticaux de 38% accompagnée d'une augmentation de la résistance d'entrée de 56% causées par une forte baisse des conductances potassiques de fuite, sensibles au refroidissement (Fig. 23A; Honoré, 2007; Marmor, 1971; Shen et Schwartzkroin, 1988; Volgushev et coll., 2000a). Le ralentissement par le froid des cinétiques d'inactivation des conductances sodiques et d'activation des conductances potassiques voltage-dépendantes sont responsables de la genèse de PAs plus amples et de plus longue durée dans les neurones du cortex et de l'hippocampe de rat *in vitro* ainsi que dans les motoneurones de chat *in vivo* (Fig. 23B; Klee et coll., 1974; Thompson et coll., 1985; Volgushev et coll., 2000a). Chez le rat, cette modification de la forme des PAs amplifie l'entrée de calcium au niveau des terminaisons axonales, augmente la libération de neurotransmetteurs mais ralentit leurs cinétiques ce qui se traduit par des potentiels postsynaptiques excitateurs plus amples mais plus lents dans les neurones du cortex *in vivo* et de l'hippocampe *in vitro* (Moser et coll., 1993; Volgushev et coll., 2000b). Le froid, en ralentissant les mécanismes de reconstitution du pool de vésicules présynaptiques disponibles peut aussi diminuer significativement la probabilité de libération des neurotransmetteurs ainsi que la fréquence des potentiels postsynaptiques miniatures, ce qui peut altérer l'efficacité de la transmission lors de fréquences de décharge importantes (Barrett et coll., 1978; Hardingham et Larkman, 1998; Volgushev et coll., 2000b).

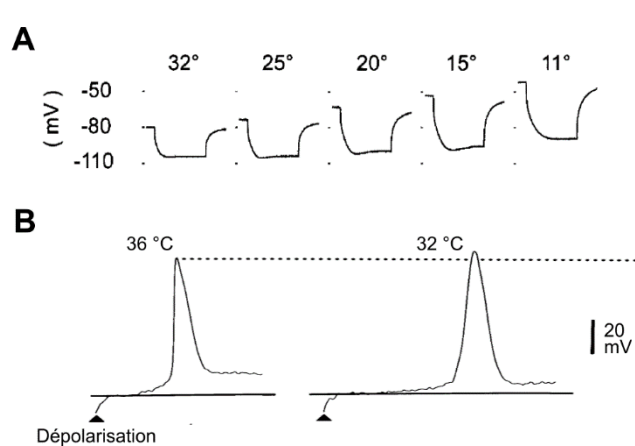


Figure 23 : Effets de la température sur les propriétés de passives de membrane et le potentiel d'action. **A**, La baisse de température de la solution d'incubation entraîne une dépolarisation du potentiel de membrane et une augmentation de la résistance d'entrée ainsi que de la constante de temps membranaire dans les neurones corticaux de rat *in vitro*. **B**, La baisse de température augmente l'amplitude des PAs évoqués par saut de potentiel (Dépolarisation) dans les neurones hippocampiques chez le rat *in vitro*. A, adapté de Volgushev et coll., 2000a ; B, adapté de Thompson et coll., 1985.

1.3.4.2 Implications sur l'excitabilité cellulaire et l'intégration sensorielle

L'atténuation des courants potassiques de fuite lors du refroidissement entraîne une augmentation la résistance d'entrée et une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones corticaux ($1 - 2 \text{ mV}/^\circ\text{C}$) qui devient ainsi plus proche des valeurs du seuil de déclenchement des PAs (Volgushev et coll., 2000a). Etant donnée la dépendance du courant seuil au niveau de potentiel membranaire (Altwegg-Boussac et coll., 2014), la sensibilité des neurones aux entrées synaptiques est également accrue au cours d'une hypothermie (Shen et Schwartzkroin, 1988; Volgushev et coll., 2000a). Cependant, les changements dans les propriétés des PAs sont accompagnés par une diminution de leur capacité à s'engager dans une décharge à haute fréquence (Klee et coll., 1974; Volgushev et coll., 2000a). Ainsi, alors qu'une dépolarisation supraliminaire appliquée à $20 - 25^\circ\text{C}$ induit un train de PAs dans un neurone pyramidale du cortex visuel chez le rat *in vitro*, la même stimulation appliquée à $13 - 14^\circ\text{C}$ n'induit qu'un seul PA (Volgushev et coll., 2000a). Dans une modélisation de neurones de l'hyperstriatum ventral de diamants mandarins, l'augmentation de la résistance membranaire et de la période d'inactivation sodique engendrait des blocs de dépolarisation dénués de décharge à 20°C pour des intensités de stimulation déclenchant des bursts intrinsèques dans les mêmes neurones modèles à 35°C (Goldin et Mindlin, 2017). Par conséquent, les neurones hypothermiques sont plus dépolarisés et plus sensibles à des entrées de faible intensité mais leur capacité à augmenter leur décharge en réponse à des stimuli d'intensité croissante (gain neuronal) est amoindrie, ainsi que leur fréquence de décharge maximale.

1.3.4.3 Mécanismes d'induction de l'état isoélectrique

Peu d'études se sont penchées sur les mécanismes de l'induction du silence électro-cérébral par le froid. L'abolition des activités cérébrales spontanées a néanmoins pu être observée *in vivo* chez le chien et le rat après des hypothermies profondes induites respectivement par refroidissement du sang dans une circulation externe et pulvérisation d'alcool refroidie sur la peau (Jia et coll., 2006; Michenfelder et Milde, 1991). L'hypothermie locale est souvent utilisée pour « mettre au silence » des aires cérébrales *in vivo* (Charpier et coll., 1999; Girard et coll., 1991; Lomber et coll., 1996; Michalski et coll., 1993). Chez le rat (Charpier et coll., 1999), le chat (Lomber et coll., 1996) et le macaque (Michalski et coll., 1993) une température inférieure à 15°C entraînait l'arrêt des activités spontanées des réseaux corticaux.

Volgushev et ses collaborateurs (2000) ont proposé un modèle des modifications de l'excitabilité menant à l'extinction des activités spontanées par le froid. Des températures entre 32 et 25 °C seraient associées à une première phase d'hypersensibilité neuronale. La dépolarisation du potentiel membranaire, l'augmentation d'amplitude des PAs présynaptiques et l'entrée de calcium plus importante dans les terminaisons axonales faciliteraient la transmission synaptique, conduisant à une augmentation de l'amplitude des réponses postsynaptiques éventuellement amplifiées par l'activation des récepteurs NMDA (Borst et Sakmann, 1998; Thompson et coll., 1985; Volgushev et coll., 2000a, 2000b). Une baisse des températures en dessous de 25°C ferait alors émerger un patron EEG de type B-S (Michenfelder et Milde, 1991; Stecker et coll., 2001), au cours duquel des périodes de suppression d'activité seraient interrompues par un unique potentiel négatif de grande amplitude (Fig. 16B; Michenfelder et Milde, 1991). Au niveau intracellulaire, l'amplification et l'allongement des potentiels postsynaptiques entraînerait une sommation temporelle anormale des dépolarisations synaptiques menant irrémédiablement toute entrée excitatrice à former un bloc de dépolarisation (Goldin et Mindlin, 2017; Volgushev et coll., 2000a, 2000b). L'accroissement de la dépolarisation pour des températures inférieures à 15 °C amènerait le potentiel membranaire des neurones au-dessus du seuil de déclenchement des PAs, les potentiels postsynaptiques dépolarisant mèneraient invariablement à un bloc de dépolarisation malgré la diminution relative de leur amplitude liée à la baisse de leur force électromotrice (Volgushev et coll., 2000a, 2000b). Chez l'homme, l'état isoélectrique induit par une hypothermie profonde est associé à une disparition des potentiels évoqués somesthésiques (Stecker et coll., 2001). Dans les aires visuelles du macaque et du chat *in vivo*, l'induction d'une hypothermie similaire

entraîne une diminution d'amplitude des réponses visuelles dans le LFP associée à une disparition de la décharge des neurones enregistrés (Girard et coll., 1991; Lomber et coll., 1996; Michalski et coll., 1993). Dans les neurones hypothermiques, la dépolarisation du potentiel membranaire, l'augmentation de la résistance d'entrée et l'amplification des dépolarisations synaptiques mèneraient, à terme, à l'induction d'un état isoélectrique associé à une perte de leurs propriétés d'excitabilité et d'intégration sensorielle.

1.3.4.4 Hypothermie et neuroprotection

Chez les patients, l'induction d'un état isoélectrique par le froid est un moyen efficace de réduire la demande métabolique cérébrale lors d'opérations nécessitant un arrêt circulatoire ou après un arrêt cardiaque menant à l'ischémie cérébrale (James et coll., 2014; Yenari et Han, 2012), puisque la consommation d'O₂ et le métabolisme du glucose diminuent de 5% par °C (Erecinska et coll., 2003; Zhao et coll., 2007). Parallèlement à ses effets sur la consommation d'O₂, le refroidissement généralisé permet aussi de ralentir les cascades apoptotiques par son action inhibitrice sur l'expression de gènes pro-apoptotiques et la libération de cytochrome C, impliqués dans l'activation des caspases (Yenari et Han, 2012). Finalement, l'hypothermie permet d'assurer l'intégrité de la barrière hématoencéphalique en limitant l'activité des protéases la dégradant lors d'ischémies de longue durée (Truettner et coll., 2005; Yenari et Han, 2012).

1.3.5 L'anoxie cérébrale

1.3.5.1 Oxygène et métabolisme neuronal

Alors que le cerveau ne représente que 2% de la masse corporelle, ses besoins énergétiques représentent, eux, 20% basale (Rolfe et Brown, 1997). Les molécules d'ATP, issues de la glycolyse et des processus de phosphorylation oxydative dépendants de l'O₂ réalisés au sein des mitochondries, sont utilisées comme source d'énergie par les neurones notamment pour maintenir leurs gradients électrochimiques et assurer les flux ioniques à travers la membrane (Eklof et coll., 1973; Hansen, 1985). L'activité de décharge des neurones étant associée à des flux ioniques plus importants, la consommation d'O₂ est étroitement corrélée à leur taux d'activité spontanée (Ames, 2000). Il est donc nécessaire de séparer le métabolisme cérébral en deux catégories : le métabolisme passif qui supporte les mécanismes de maintien d'un cerveau inactif (5 – 15 % de la consommation totale d'énergie par le cerveau) et le métabolisme dit

« d'activation » qui supporte les mécanismes liés aux activités synaptiques et de décharge des neurones (85 – 95 % de la consommation totale d'énergie) (Ames, 2000; Hansen, 1985). Attwell et Laughlin ont pu calculer que pour un neurone relayant une décharge spontanée à une fréquence de 4 Hz, l'énergie dépensée par l'ouverture des récepteurs postsynaptiques et celle impliquée dans la genèse de PAs représentent respectivement 34% et 47% de la totalité du budget énergétique « d'activation » du neurone (Fig. 24A; Attwell et Laughlin, 2001). Il est à noter que l'activation des neurones, et donc l'entrée massive de sodium dans le milieu intracellulaire, perturbe localement le gradient électrochimique et rend nécessaire le transport actif de sodium vers le milieu extracellulaire. La pompe Na^+/K^+ ATPase (Na/K-p), par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP entraînant la sortie de 3 ions sodium et l'entrée de 2 ions potassium (Fig. 24B), permet de rééquilibrer les concentrations des deux types d'ions de part et d'autre de la membrane et son activité est d'autant plus intense que la fréquence de décharge neurone est élevée (Kaplan, 2002; Wang et Huang, 2006). Des expériences réalisées *in vitro* chez le rat et *in vivo* chez le chien ont montré une réduction non négligeable de la consommation globale d' O_2 après blocage de la Na/K-p par l'ouabaïne, démontrant la part importante du transport actif d'ions dans le métabolisme d'activation (Fig. 24A; Astrup et coll., 1981; Whittam, 1962). Les processus liés à l'activité neuronale, de par leurs importants besoins énergétiques seraient donc les premiers affectés par une altération de l'apport central en O_2 .

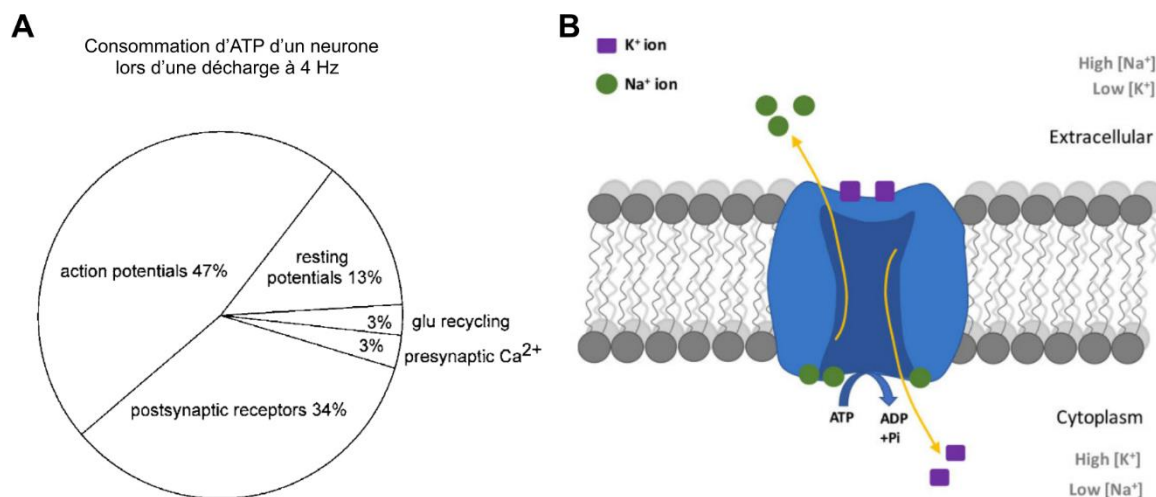


Figure 24 : Le métabolisme d'activation dans les neurones. **A**, Distribution de la consommation d'ATP du métabolisme d'activation dans un neurone déchargeant régulièrement à 4 Hz. Dans un neurone, la majorité de l'ATP produit est utilisée par les mécanismes de la génération et la propagation des PAs (47 %), l'établissement des flux ioniques postsynaptiques (34 %) et le maintien du potentiel de « repos » (13 %) assuré par la Na/K-p. Ici 100% = $3,29 \times 10^9$ molécule d'ATP/s. **B**, Schéma représentant la sortie de 3 ions sodium et l'entrée de 2 ions potassium résultant de l'activation de Na/K-p. A, adapté de Attwell et Laughlin, 2001 ; B, adapté de Pivovarov et coll., 2019.

1.3.5.2 Effets de l'anoxie sur l'activité spontanée des neurones

Le métabolisme d'activation des neurones étant plus demandeur en énergie, les mécanismes liés à la genèse de PAs seront les premiers à être affectés par une réduction (hypoxie) ou un arrêt complet (anoxie) de l'oxygénation du cerveau (Hansen, 1985). Une anoxie conduit *in fine* à un arrêt des activités neuronales. Les modifications d'activité engendrées par la privation du cerveau en O₂ peuvent être séparées en quatre périodes distinctes (Somjen, 2004). Décrites pour la première fois par Baumgartner et ses collaborateurs (1961) dans un modèle rongeur d'asphyxie (Baumgartner et coll., 1961). Ces 4 périodes consistent en : 1) une période durant laquelle les fluctuations de potentiel infraliminaire et l'activité de décharge restent inchangées, 2) une période d'activité plus intense durant laquelle on peut observer à l'EEG des fluctuations rapides de fréquence bêta-gamma (15 – 40 Hz), 3) une période de ralentissement des fluctuations de potentiel EEG (1 – 5 Hz) et finalement 4) un EEG isoélectrique.

1.3.5.2.1 Modifications post-anoxiques précoces

La phase d'activité à haute fréquence (période 2) a été décrite pour la première fois *in vitro* dans les ganglions abdominaux d'écrevisses aux suites de l'application dans la solution d'incubation d'azote, de cyanure de sodium, de monoxyde de carbone ou encore de 2,4 – dinitrophenol. Elle était caractérisée, durant la première minute post-anoxique, par une augmentation de 5 à 15 Hz de la décharge des neurones qui ensuite déclinait l'arrêt complet obtenu 5 à 10 minutes après le début de l'anoxie (Fig. 25A; Prosser et Buehl, 1939). Ce phénotype post-anoxique semble avoir été conservé au cours de l'évolution puisque des résultats similaires ont été rapportés dans les ganglions stomato-gastriques de homards après réduction de la pression artérielle (Massabuau et Meyrand, 1996), dans le cortex somatosensoriel de poules respirant de l'argon pur (Raj et coll., 1992) et dans le cortex et l'hippocampe de rongeurs après un arrêt cardiaque (Fig. 25B; Borjigin et coll., 2013), une décapitation (Kongara et coll., 2014; Vanderwolf et coll., 1988), l'administration de doses létales d'anesthésiants (Zhang et coll., 2019) ou une asphyxie (Lee et coll., 2017). Des mécanismes permettant d'expliquer cette bouffée d'activité post-anoxique ont été proposés. Des études menées *in vitro* sur des cellules pyramidales hippocampiques et corticales rapportent ainsi une nette augmentation de la fréquence des courant postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs rapides, quelques secondes après une privation d' O₂ et de glucose (Allen et Attwell, 2004; Revah et coll., 2016). Cette augmentation de fréquence persistait après

application de tétrodotoxine (TTX), un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants, suggérant l'implication des mécanismes de libération de neurotransmetteur ne dépendant pas des PAs dans la réponse précoce des neurones à l'anoxie (Allen et Attwell, 2004; Revah et coll., 2016). Revah et ses collaborateurs (2016) ont quant à eux détecté dans le cortex somatosensoriel primaire de souris une augmentation post-anoxique de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (Revah et coll., 2016), dont les délais sont compatibles avec la période d'activité à haute fréquence enregistrée dans l'EEG (Silver et Erecinska, 1990). L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ résulterait d'une activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques *via* une augmentation du glutamate extracellulaire (Binshtok et coll., 2006; Katchman et Hershkowitz, 1993; Revah et coll., 2016). Enfin, une hausse d'amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs, liée à une augmentation de la synthèse et une baisse de la dégradation du GABA a été observée dans les neurones hippocampiques *in vitro* dans les mêmes périodes de temps (Allen et Attwell, 2004; Madl et Royer, 2000). Lors de la première minute post-anoxique, une libération précoce de glutamate serait donc responsable de la mise en jeu de mécanismes synaptiques pouvant engendrer la bouffée d'activité à haute fréquence visible dans l'EEG.

Cette courte période d'activité neuronale intense et énergétiquement coûteuse (Ames, 2000; Kann et coll., 2011) fait ensuite place à un patron d'activités plus lentes dont la fréquence est comprise entre 1 et 5 Hz. La dégradation des activités cérébrales de fond vers des oscillations lentes a été décrite dans différentes structures et espèces (Borjigin et coll., 2013; Hossmann and Kleihues, 1973; Lee et coll., 2017; Raj et coll., 1992). Les mécanismes précis et les structures génératrices de ces rythmes post-anoxiques lents restent à décrire mais des angles de réflexion existent cependant.

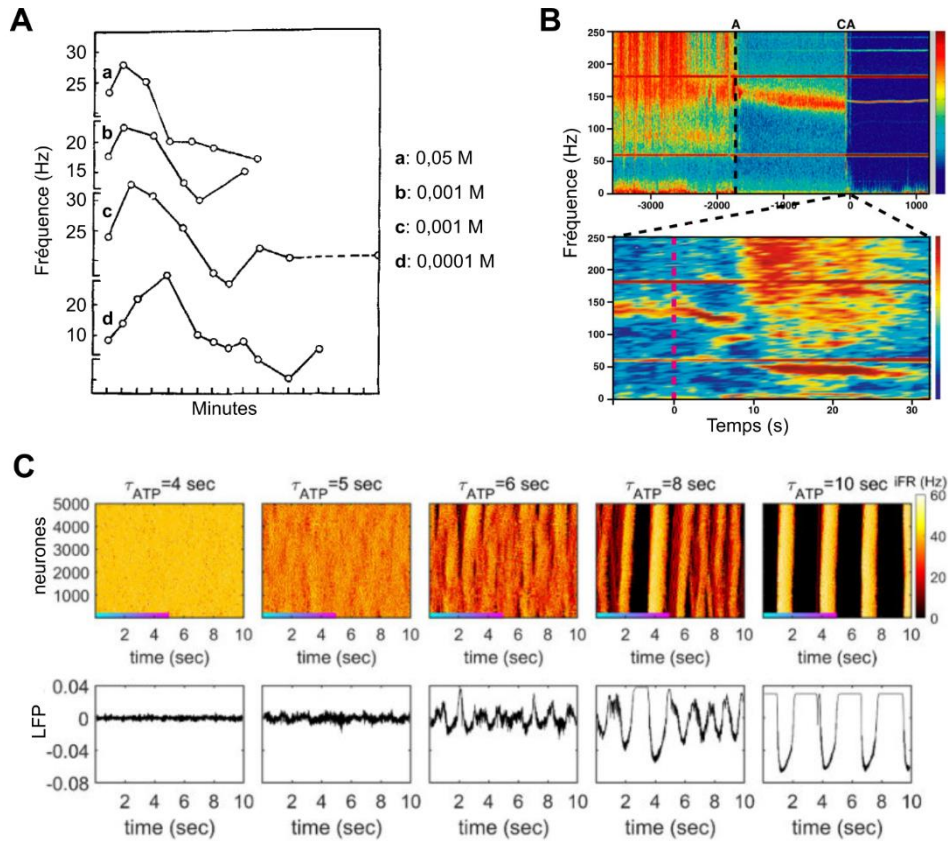


Figure 25 : Effets de l’anoxie sur la dynamique des activités synaptiques. **A**, Taux de décharge des neurones des ganglions abdominaux d’écrevisses après application de différentes concentrations de 2,4 – dinitrophenol (concentrations indiquées en a, b, c et d). Noter l’augmentation du taux de décharge dans les premières minutes post-anoxiques. **B**, Activité EEG chez le rat après arrêt cardiaque (CA). L’élargissement des premières secondes post-CA (panneau du bas) montre une augmentation de la puissance relative des activités à haute fréquence (> 40 Hz). **C**, Modélisation mathématique d’un réseau de neurones « leaky integrate and fire ». L’augmentation de la durée de reconstitution des stocks d’ATP (T_{ATP}) entraîne l’adoption par les neurones d’un régime d’activité oscillatoire dont la fréquence est inversement corrélée à T_{ATP} . A, adapté de Prosser et Buehl, 1939 ; B, adapté d’après Borjigin et coll., 2013 ; C, adapté d’après Joo et coll., 2021.

Une étude mêlant électrophysiologie *in vitro* et *in silico* sur des neurones du cortex entorhinal de rat, a montré que les transitions entre différents régimes d’activité dépendaient de l’interaction entre l’activité cérébrale de fond et le métabolisme neuronal, impliquant notamment les canaux potassiques sensibles à l’ATP (K_{ATP}) (Cunningham et coll., 2006). Ces canaux sont sensibles à la concentration intracellulaire d’ATP et s’activent lorsque celle-ci diminue (Ashcroft et Ashcroft, 1990; Cook et Hales, 1984). Ainsi, selon ces auteurs, le blocage des canaux K_{ATP} dans les neurones du cortex entorhinal permet de passer d’un régime oscillatoire à un régime d’activité soutenue tandis que l’activation exacerbée de ces canaux hyperpolarise les neurones et atténue toute forme d’activité dans le réseau cortical (Cunningham et coll., 2006). Ces résultats ont été récemment corroborés par des travaux de modélisation

montrant qu'en augmentant le délai de reconstitution des stocks d'ATP intracellulaires (T_{ATP}) et donc en prolongeant la période d'activation des canaux K_{ATP} , le réseau modèle était capable d'adopter un comportement oscillatoire (Fig. 25C). La fréquence des oscillations et leur cohérence spatio-temporelle étaient étroitement corrélées avec T_{ATP} (Fig. 25C; Joo et coll., 2021). Ainsi, les ondes lentes qui surviennent de façon plus ou moins rythmique au cours de la troisième période du processus anoxique pourraient être liées à l'activité des canaux K_{ATP} .

1.3.5.2.2 *Etat isoélectrique*

Lorsque l'anoxie cérébrale se prolonge, les activités lentes se ralentissent, diminuent en amplitude jusqu'à disparaître. Le tracé EEG devient alors isoélectrique, dénué de toute fluctuation de potentiel électrique. Chez l'homme, cet arrêt des activités cérébrales est observé après un arrêt cardiaque faisant suite à une fibrillation ventriculaire (Clute et Levy, 1990) mais aussi après des syncopes vasovagales associées à une baisse drastique de la pression artérielle (Ammirati et coll., 1998). L'enregistrement simultané de l'EEG, du débit sanguin cérébral (DSC) et de l'électrocardiogramme chez des patients au moment de l'arrêt cardiaque montre que le silence électro-cérébral est atteint après l'abolition du DSC (Matory et coll., 2021). Ainsi, la diminution du DSC vers les valeurs seuils de l'infarctus cérébral (12 ml / 100g / min) et ses effets délétères sur le métabolisme cérébral seraient directement liés à l'arrêt des activités corticales (Foreman et Claassen, 2012; Nagata et coll., 1989). De façon intéressante, une occlusion artérielle réalisée dans un modèle rongeur induit également un arrêt du DSC mesuré à la surface du cortex concomitante d'un arrêt de la décharge dans les neurones hippocampiques et l'établissement de l'état isoélectrique (Xu et Pulsinelli, 1996).

Une somme d'études réalisées *in vitro* mettent en évidence une cascade d'évènements cellulaires pouvant supprimer les activités de décharge spontanées des neurones hippocampiques après une privation d' O_2 et de glucose. Premièrement, la forte baisse des concentrations intracellulaires en ATP mène à l'intensification de l'activité des canaux K_{ATP} (Cunningham et coll., 2006; Jiang et Haddad, 1997) qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration extracellulaire en potassium ($[K^+]_e$) (Hansen et coll., 1982). L'ouverture des canaux K_{ATP} hyperpolarise le potentiel membranaire (Cunningham et coll., 2006; Fujimura et coll., 1997) et augmente la conductance membranaire globale des neurones (Xu et Pulsinelli, 1994). Ces modifications combinées des propriétés passives de membrane entraînent l'éloignement du potentiel du seuil de déclenchement des PAs (environ -50 mV) associé à un shunt des entrées synaptiques excitatrices. Les courants et potentiels postsynaptiques sont

moins amples et plus courts (Khazipov et coll., 1995; Rosen et Morris, 1993; Zhu et Krnjević, 1994), atténuant ainsi la sommation temporelle des entrées synaptiques et la probabilité de décharge des neurones. Cette atténuation de l'amplitude et de la durée des entrées synaptiques dépolarisantes pourrait être accentuée par une diminution de la libération de neurotransmetteurs excitateurs. En effet la diminution d'ATP intracellulaire (Kostyuk, 1984; Young et Somjen, 1992) et la libération d'adénosine par les neurones (Gervitz et coll., 2001; Pedata et coll., 1993; Yoon et Rothman, 1991), activant les récepteurs A1, entraîne un blocage des canaux calciques présynaptiques Ca_v 2.1 et Ca_v 2.2.

Si l'apport en O_2 au cerveau n'est pas rétabli et que l'état isoélectrique post-anoxique se prolonge, les altérations du métabolisme d'activation des neurones s'aggravent. On observe alors une accumulation progressive de la concentration intracellulaire en calcium $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones corticaux (Silver et Erecinska, 1990) probablement due à une dysfonction des pompes calciques ATP-dépendantes (Meyer, 1989). Le silence électro-cérébral post-anoxique prolongé s'accompagne aussi d'une accélération de l'augmentation de $[K^+]_e$ liée à la diminution de l'activité des Na/K-p (Hansen, 1985). L'ensemble de ces modifications ioniques vont s'accroître pour finalement conduire à une dépolarisation massive des neurones, appelée dépolarisation anoxique (AD), qui suit l'établissement de l'état isoélectrique.

1.3.5.3 La dépolarisation anoxique

Considérée lors de sa découverte comme un marqueur du début des processus de mort cellulaire conduisant inéluctablement à la mort cérébrale, l'onde EEG de surface associée à l'AD neuronale fut baptisée « onde de la mort » (OdM) chez les rongeurs (Fig. 26B; van Rijn et coll., 2011; Zandt et coll., 2011) et *terminal spreading depolarization* (TSD) chez l'homme (Fig. 26A; Carlson et coll., 2019; Dreier et coll., 2018). Cette large déflexion triphasique vient interrompre transitoirement le tracé EEG isoélectrique lorsque les stocks d'ATP cérébraux sont réduits au seuil critique de 13 – 18 % de leur valeur normale (Verhaegen et coll., 1995). Le délai d'apparition de l'OdM dépend de l'espèce étudiée, des conditions expérimentales d'enregistrement et de la cause de l'anoxie. Enregistrée dans des préparations *in vitro* de cortex cérébral, le délai d'apparition de l'OdM peut varier de 1 à 12 minutes après l'arrêt métabolique en fonction des concentrations de glucose présentes dans le bain de superfusion (Hansen, 1978; Lipton, 1999). Van Rijn et ses collaborateurs (2011) ont quant à eux montré *in vivo* chez le rat

que ces délais de survenue dépendaient de l'état de vigilance, puisque la latence de l'OdM était augmentée (~80 s) lorsque la décapitation survenait chez l'animal préalablement anesthésié à l'isoflurane comparé à un animal éveillé (~50 s ; Fig. 26B). La latence de survenue de l'OdM pouvant même atteindre plusieurs minutes lorsque la mort était induite par une injection de doses létales de barbituriques (van Rijn et coll., 2011). Dans un modèle rongeur d'ischémie cérébrale causée par application de chlorure de potassium (KCl) directement sur le cerveau, une baisse de la température corporelle des animaux à 33 °C retardait l'apparition de l'OdM de 5 minutes comparé à la situation normothermée (Takaoka et coll., 1996). Enfin, chez des patients ayant subi des atteintes cérébrales dévastatrices et irréversibles menant à un arrêt des soins, l'extubation et la chute de pression artérielle conduit à la survenue d'une TSD dans un délai de 13 à 266 secondes (Fig. 26A; Dreier et coll., 2018). L'enregistrement de l'OdM avec un amplificateur *DC* montre que cette onde est le reflet filtré (en général avec un filtre passe-haut à 0,1 Hz) d'une déflexion de potentiel négative de grande amplitude (*DC shift*) dans le milieu extracellulaire (Fig. 27; Hansen, 1978) qui coïncide avec la dépolarisation massive des neurones.

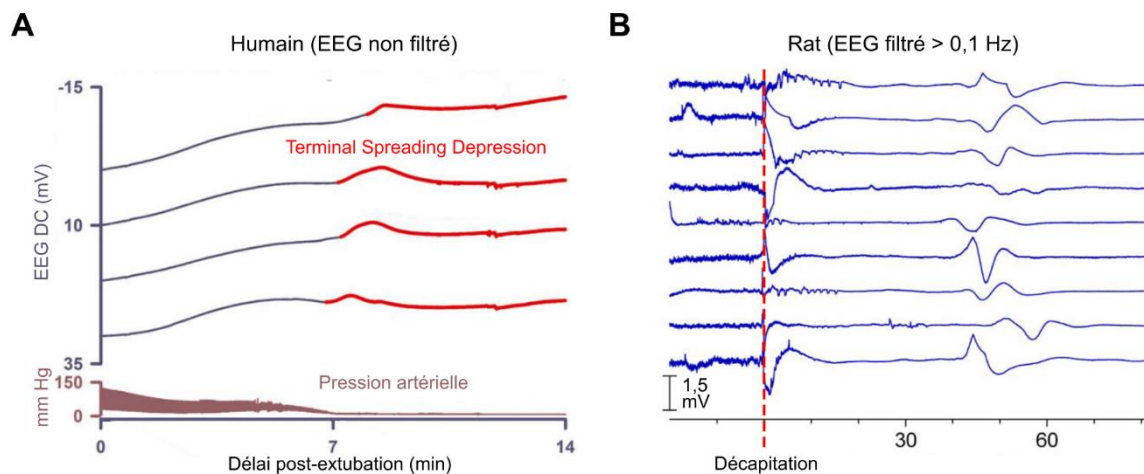


Figure 26 : La Terminal Spreading Depolarization ou Onde de la Mort. **A**, Enregistrement de l'EEG non filtré chez un patient après extubation. La TSD (segments rouges) est observable 1 à 2 minutes après l'abolition de la pression artérielle. **B**, Enregistrement d'un EEG filtré en passe-haut à 0,1 Hz chez le rat après décapitation. L'ample onde triphasique baptisée OdM est enregistrée ici 45 secondes après la décapitation. A, modifié d'après Dreier et coll., 2018 ; B, adapté d'après van Rijn et coll., 2011.

1.3.5.3.1 Mécanismes

L'AD est une dépolarisation massive (40 – 50 mV) des neurones qui résulte d'une cascade de bouleversements ioniques initiée par la compromission du fonctionnement des Na/K-p (Lipton, 1999; Pietrobon et Moskowitz, 2014). L'application d'ouabaine, un inhibiteur spécifique des Na/K-p, permet de reproduire *in vivo* (Lipton, 1999) et *in vitro* (Balestrino, 1995) une AD similaire à celle observée durant l'anoxie. L'augmentation de $[K^+]_e$ (de 3 – 4 à 10 – 12 mM) pendant la période isoélectrique, due à l'activation des canaux K_{ATP} crée une force électromotrice qui, en synergie avec l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ issue du relargage des stocks intracellulaires et du dysfonctionnement des pompes calciques ATP-dépendantes (Meyer, 1989), favorise la dépolarisation du potentiel transmembranaire. L'arrêt progressif, puis définitif, des Na/K-p conduit à une accumulation considérable de potassium dans le milieu extracellulaire (de 10 – 12 à 60 – 80 mM) (Fig. 27; Hansen, 1985; Pietrobon et Moskowitz, 2014), qui dépolarise plus avant les neurones jusqu'au seuil de déclenchement des PAs parfois visibles sur le flanc de montée de l'AD (Zandt et coll., 2011). Cette décharge des neurones permet l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants (responsables de la repolarisation des PAs) et l'intensification de la sortie de potassium (Zandt et coll., 2011). La dépolarisation du potentiel de membrane va alors permettre l'activation des conductances sodiques et calciques voltage-dépendantes à l'origine d'un courant entrant auto-entretenu. Des études pharmacologiques suggèrent également que l'activation des récepteurs NMDA et AMPA, par une libération de glutamate dépendante ou non du calcium, soit également impliquée dans l'initiation et le développement de l'AD (Lipton, 1999; Pietrobon et Moskowitz, 2014). La contribution relative des canaux sodiques, calciques et des récepteurs glutamatergiques à l'AD semble dépendre de l'âge et de la région cérébrale considérée (Müller et Somjen, 1998; Pietrobon et Moskowitz, 2014). Le blocage de l'AD par des inhibiteurs des canaux sodiques voltage-dépendants comme la TTX, la lidocaïne ou la dibucaïne (Douglas et coll., 2011; Weber et Taylor, 1994) a cependant permis de confirmer l'implication des courants sodiques dans le développement de l'AD. L'arrêt des Na/K-p devrait entraîner l'annulation des gradients électro-chimiques mais lorsque l'AD atteint son plateau, le potentiel de membrane se stabilise autour de valeurs négatives car les neurones contiennent environ 148 mM de macromolécules négativement chargées (Dijkstra et coll., 2016), incapables de traverser la bicouche lipidique et entraînant un arrêt de la dépolarisation au potentiel de Gibbs-Donnan (Stell et Joslin, 1986). Sa valeur théorique dans le neurone est de -20 mV et se confirme *in vivo* lorsque les cellules pyramidales hippocampiques atteignent l'apex de l'AD (Xu et Pulsinelli,

1994). Ces bouleversement ioniques sont associés à un changement de réactivité des neurones puisque différents travaux ont décrit une diminution de la réponse en voltage des neurones hippocampiques et corticaux à des échelons de courant hyperpolarisants lors de l'AD, changements de voltage qui devenaient quasiment indétectables au cours du plateau (Czéh et coll., 1993; Hansen et coll., 1982).

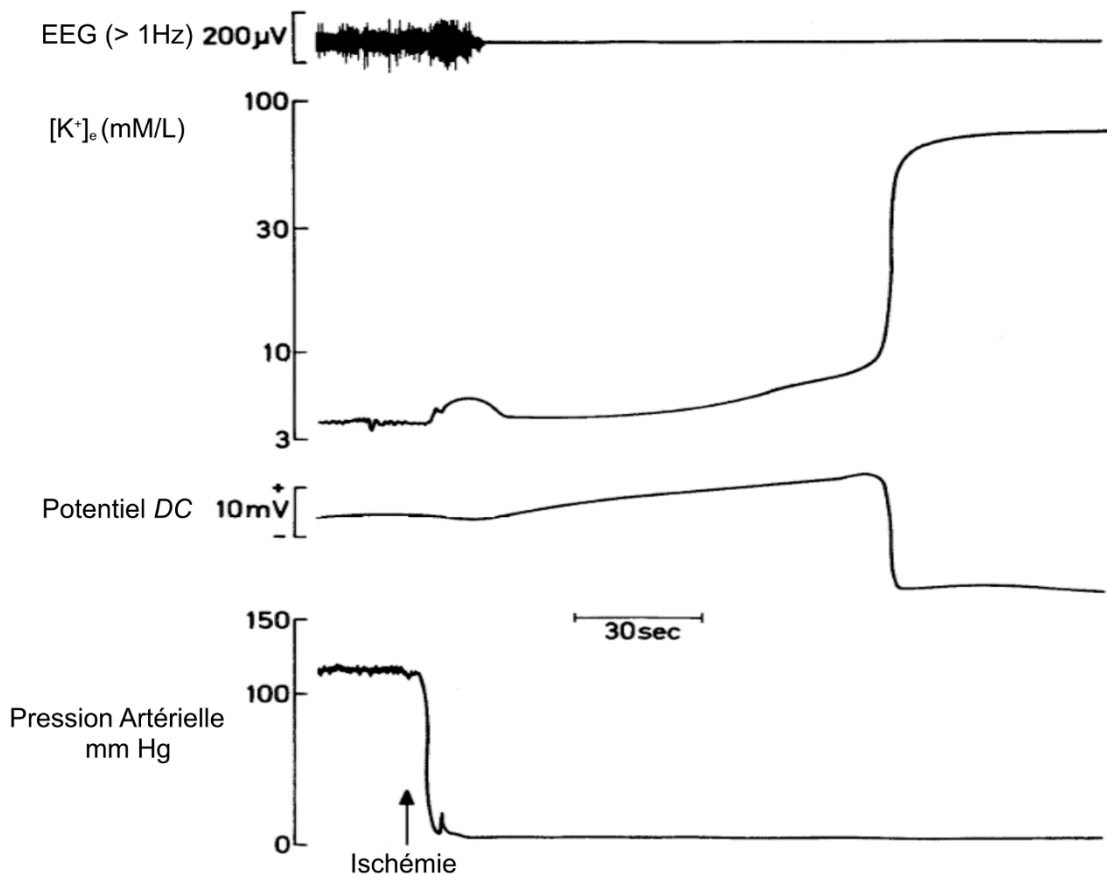


Figure 27 : La dépolarisation anoxique vue du milieu extracellulaire. Activité EEG, concentration extracellulaire de potassium ($[K^+]_e$) et potentiel DC extracellulaire dans le cortex de rat après arrêt cardiaque (flèche) menant à la chute de la pression artérielle. D'après Hansen, 1978.

1.3.5.3.2 *Initiation et propagation de l'AD*

Le développement de l'AD et la perte des propriétés intégratives neuronales qui s'ensuit ne surviennent pas de façon simultanée dans l'ensemble du cerveau lors d'une anoxie globale. Des études réalisées *in vitro* chez le rat ont montré que les neurones des structures diencephaliques, en particulier les cellules magnocellulaires endocrines du noyau supraoptique et les neurones du locus cœruleus, étaient plus résistants à la suppression d'O₂ et de glucose dans le bain de

superfusion (Brisson et Andrew, 2012; Brisson et coll., 2014). Ainsi, comparés aux neurones de l'hippocampe et du cortex, les neurones diencephaliques présentent une AD plus tardive et peuvent survivre à des anoxies de plus longues durées (Brisson et Andrew, 2012; Brisson et coll., 2014) suggérant une sensibilité accrue des structures télencéphaliques à l'anoxie (Brisson et coll., 2013). Examinant les propriétés d'initiation et de propagation de l'AD au niveau cortical dans un modèle d'anoxie globale chez la souris, Bogdanov et ses collaborateurs (2016) ont pu mettre en évidence un départ préférentiel de l'AD dans les aires corticales somesthésiques recevant des informations tactiles issues des vibrisses et des membres antérieurs. De façon encore plus précise, il a récemment été démontré que la suppression d'O₂ et de glucose du bain de superfusion de tranches de cortex de rat entraînait une initiation de l'AD dans les couches corticales granulaires (Juzekaeva et coll., 2017).

Lors de sa découverte *in vivo* chez le lapin après application de stimulations électriques tétaniques excitotoxiques, l'équivalent extracellulaire de l'AD a été baptisé « spreading depression of activity » car celui-ci semblait se propager de la zone de stimulation dans les aires corticales frontales vers les aires occipitales (Leao, 1944, 1947). La vitesse de propagation de l'AD est extrêmement lente, de 2 à 5 mm/min. Elle se propage de façon plus ou moins sphérique du foyer anoxique, ou site d'initiation, vers la périphérie (Farkas et coll., 2008; Világi et coll., 2001).

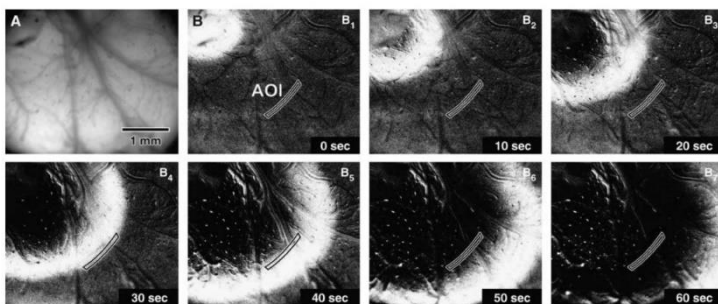


Figure 28 : Propagation de l'AD induite par injection locale de KCl. Cette succession d'images montre par imagerie voltamétrique le front de propagation de l'AD depuis le coin supérieur gauche de l'image où du KCl a été injecté. Adapté d'après Farkas et coll., 2008.

Les mécanismes mis en jeu dans la propagation de l'AD ne sont pas encore pleinement connus mais il semblerait que la diffusion du potassium joue un rôle clé dans cette propagation (Hansen, 1985; Lipton, 1999; Pietrobon et Moskowitz, 2014). En effet la dilution du milieu extracellulaire par microdialyse de liquide céphalorachidien artificiel (ACSF) chez le rat *in vivo* inhibe la propagation de l'AD (Obrenovitch et coll., 1995), qui peut être restaurée par l'injection de fortes concentrations de potassium dans le milieu extracellulaire (Obrenovitch et Zilkha,

1995). La recapture de potassium extracellulaire par l'isoforme astrocytaire $\alpha 2$ de la Na/K-p (Kofuji et Newman, 2004) joue un rôle important dans le développement du front de propagation de la SD. Ainsi, le blocage spécifique du métabolisme astrocytaire par le fluoroacétate ou le fluorocitrate accélère la vitesse de propagation de l'AD dans l'hippocampe *in vivo* et *in vitro* (Largo et coll., 1997; Seidel et Shuttleworth, 2011). Ces résultats suggèrent que le déclenchement d'une AD dans le foyer anoxique et l'augmentation de $[K^+]_e$ en résultant génèrent une vague potassique qui se diffuse dans le milieu interstitiel et facilite le développement d'un front de propagation de l'AD en accélérant la dépolarisation des neurones avoisinants.

1.3.5.3.3 Conséquences structurelles

L'équilibre de Gibbs-Donnan, principale cause de la stabilisation du potentiel membranaire des neurones lors de l'AD est également responsable d'altérations morphologiques et structurelles. Lorsque l'AD arrive à son plateau, le transport ionique actif est aboli et le flux net de toutes les espèces ioniques est nul. Toutefois la subsistance dans le milieu intracellulaire de polyanions entraîne une augmentation de la pression osmotique qui provoque une entrée d'eau dans le neurone par les aquaporines et un gonflement somatique (Fig. 29B; Pietrobon et Moskowitz, 2014) probablement aggravé par la synthèse de molécules à activité osmotique, comme l'acide lactique issu du métabolisme anaérobie (Tranum-jensen et coll., 1979). La combinaison de techniques de microscopie biphotonique, d'enregistrement du potentiel *DC* extracellulaire et de modélisation biophysique a notamment permis de montrer une augmentation de 24 – 30% de la surface somatique des neurones au moment du plateau de l'AD (Fig. 29A; Dijkstra et coll., 2016; Takano et coll., 2007). Ce gonflement des neurones va de pair avec une augmentation de la résistivité électrique du milieu extracellulaire dont la mesure constitue la preuve de modifications structurelles des tissus cérébraux durant l'anoxie (Freygang et Landau, 1955; Hossmann, 1971).

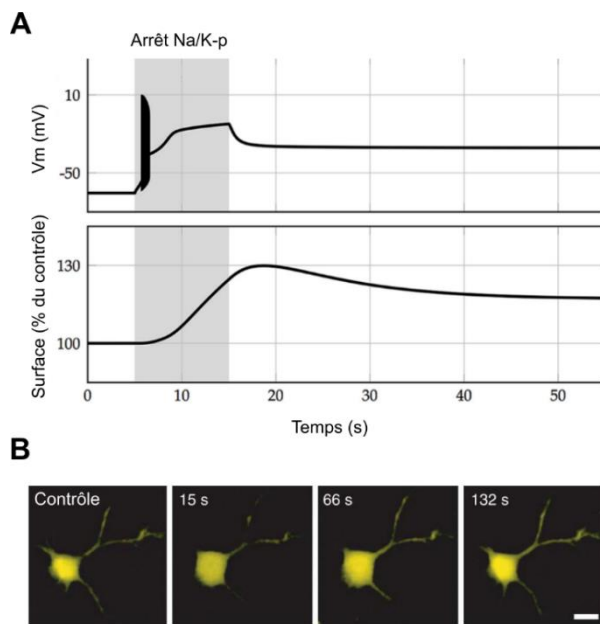


Figure 29 : Conséquences de l'AD sur la morphologie cellulaire. **A**, Modélisation mathématique du potentiel (panneau du haut) et de la surface membranaire (panneau du bas) d'un neurone cortical pendant un arrêt du fonctionnement des Na/K-p (rectangle gris). Noter que l'augmentation maximale de la surface cellulaire est atteinte peu après l'arrivée du potentiel membranaire au plateau de la dépolarisation anoxique. **B**, Microphotographies d'un neurone cortical de souris exprimant la Yellow Fluorescent Protein avant et 2 minutes après l'induction d'une SD par injection locale de KCl. A, modifié d'après Dijkstra et coll., 2016 ; B, adapté d'après Takano et coll., 2007.

1.3.5.4 Conséquences cliniques

Le coma isoélectrique anoxique chez les patients peut être conséquence de traumatismes crâniens dévastateurs, d'arrêts cardiaques prolongés ou d'encéphalopathies métaboliques (Husain, 2006; Kaplan, 2004). L'état isoélectrique est le profil EEG le plus péjoratif chez les patients ayant subi une anoxie cérébrale selon la plupart des échelles pronostiques (Scollo-Lavizzari et Bassetti, 1987; Synek, 1990). Le coma est alors irréversible et mène à la mort encéphalique (Laureys, 2005; Wijdicks et coll., 2010) ou dans de rares cas à un état végétatif persistant (Young, 2011). Nous allons cependant voir que l'état isoélectrique anoxique n'est pas, par nature, irréversible ou associé à une mort neuronale.

1.4 Buts spécifiques et approches expérimentales

Le but spécifique de mes recherches était d'établir des stratégies expérimentales, et analytiques, pour étudier les propriétés neurophysiologiques d'états cérébraux isoélectriques de différentes étiologies. Elles s'inscrivent dans la continuité des travaux de mon laboratoire d'accueil sur les conséquences fonctionnelles des comas isoélectriques induits par les barbituriques chez des patients en service de soins intensifs neurologiques et dans des modèles animaux analogues (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2016, 2017). Mes expériences ont toutes été menées *in vivo* chez le rongeur avec une approche multi-échelles (de la résolution intracellulaire à l'EEG de surface), laquelle est requise quand il s'agit de comprendre l'origine et les propriétés fonctionnelles d'un état cérébral aussi extrême et méconnu.

1.4.1 De nouvelles questions...

Une série d'études réalisées préalablement au laboratoire ont remis en question l'idée dominante qu'un état cérébral isoélectrique, EEG plat indiquant un arrêt des activités électrophysiologiques spontanées dans (au moins) le cortex cérébral, est synonyme d'une dissolution des propriétés intégratives du cortex et de ses neurones. Elles ont démontré que les neurones corticaux, thalamiques et hippocampiques étaient toujours excitables et que le système thalamo-cortical était capable d'intégrer et de propager des informations périphériques jusqu'au néocortex alors que le patient, ou le rongeur, était plongé dans un coma isoélectrique induit à l'aide de barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2016, 2017). Cette situation inattendue est-elle spécifique de ce type d'anesthésie ou généralisable à d'autres dépresseurs du système nerveux central ? J'ai d'abord cherché à déterminer si l'excitabilité intrinsèque des neurones corticaux et thalamiques persistait au cours d'une autre anesthésie pharmacologique précipitant un état isoélectrique, et si le circuit sensoriel thalamo-cortical correspondant était encore fonctionnel. J'ai par la suite voulu élargir ce questionnement à d'autres conditions, non pharmacologiques, affectant le fonctionnement métabolique du cerveau. J'ai ainsi participé à la mise au point d'un nouveau modèle d'asphyxie *in vivo* chez le rat visant à identifier et décrire les propriétés des neurones et des réseaux lors d'une anoxie cérébrale durable (plusieurs minutes), causant une suppression progressive de l'activité corticale spontanée et l'apparition ultérieure d'ondes cérébrales caractéristiques des lésions anoxiques des neurones. A ma connaissance, aucune étude n'avait auparavant décrit intégralement et en temps réel, l'évolution des activités et propriétés neuronales lors d'une anoxie menant à un silence électro-cérébral

péri-mortem. Cette première étude (Schramm et coll., 2020) a démontré que, contrairement aux conditions pharmacologiques, l'état isoélectrique induit par la privation d'O₂ est corrélé à des modifications de l'excitabilité neuronale, jusqu'à sa dissolution intégrale. Finalement, j'ai entrepris dans le même modèle *in vivo* d'anoxie cérébrale, une étude visant à identifier pour la première fois les dynamiques spatio-temporelles d'initiation et de développement des processus anoxiques au sein du néocortex.

1.4.2 ...et leurs stratégies d'étude

1.4.2.1 Etude 1

J'ai développé un nouveau modèle de coma isoélectrique *in vivo* chez le rat en induisant le silence électro-cérébral par une forte dose d'isoflurane (3,5 – 4 %). L'isoflurane, comme nous l'avons vu dans l'introduction (chapitre 1.3.3.2), a des actions cellulaires plus délétères sur la transmission synaptique excitatrice que les barbituriques. J'ai pu donc analyser les différents paramètres de l'excitabilité corticale dans une tout autre condition pharmacologique. Par des enregistrements intracellulaires *in vivo*, j'ai analysé l'impact de l'induction de l'état isoélectrique par l'isoflurane sur les propriétés intégratives de membrane (R_m et T_m), les paramètres de l'excitabilité intrinsèque neuronale (courant seuil et gain neuronal) et la fiabilité de la fonction sortie des neurones (régularité inter-essai et du patron temporel de la décharge de PAs) des neurones corticaux. J'ai également appliqué de manière itérative une déflexion des vibrisses lors d'un état contrôle, un état isoélectrique stable mais aussi tout au long de l'induction de celui-ci. L'enregistrement de potentiels évoqués dans l'ECOG, de réponses synaptiques dans les neurones du cortex somatosensoriel primaire et de la décharge des neurones thalamo-corticaux m'a permis de mettre en évidence le maintien, bien que perturbé, de l'intégration sensorielle, au sein de la voie thalamo-corticale somatosensorielle, lors de ce nouvel état isoélectrique.

1.4.2.2 Etude 2

J'ai participé au développement d'un nouveau modèle d'anoxie cérébrale *in vivo* chez le rat anesthésié et curarisé. L'anoxie était induite par l'arrêt de la ventilation artificielle, interrompant brutalement l'apport en O₂ du cerveau. Dans cette étude, j'ai dans un premier temps réalisé des enregistrements ECOG couplés à des enregistrements vidéo de l'état et du réflexe pupillaire des animaux tout au long du protocole d'anoxie. Ces enregistrements ont permis de lier les altérations de l'activité électrophysiologique corticale spontanée causées par l'anoxie avec un

indice fiable du fonctionnement du tronc cérébral (Ritter et coll., 1999). J'ai ensuite réalisé des enregistrements ECoG et intracellulaires simultanés dans le cortex somatosensoriel primaire lors de protocoles d'asphyxie afin de décrire les modifications conjointes de l'activité synaptique spontanée et des propriétés intégratives des neurones pyramidaux. J'ai donc été en mesure de décrire en temps réel les différentes altérations de l'activité spontanée des neurones corticaux lors de l'induction de l'état isoélectrique par l'anoxie, incluant des séquences de patrons caractéristiques et les propriétés de l'OdM, considérée à tort avant cette étude comme un reflet de la mort neuronale (van Rijn et coll., 2011), et la découverte de l'OdR, marqueur robuste d'une récupération des activités corticales après une réanimation réussie.

1.4.2.3 Etude 3

Dans cette dernière étude, pour l'instant non-publiée, j'ai implémenté le modèle d'anoxie cérébrale *in vivo* et raffiné les échelles spatiales d'analyse, en associant des enregistrements LFP multisites, un ECoG, des enregistrements intracellulaires et le recueil du potentiel *DC* intracortical (extracellulaire local) dans les différentes couches du cortex somatosensoriel primaire. Par cette nouvelle approche électrophysiologique, couplée à des manipulations pharmacologiques locale, il m'a été possible de déterminer si le développement des processus anoxiques décrits lors de notre étude précédente se faisait de manière homogène au sein de la colonne corticale ou à partir de zones/neurones particuliers. Cette étude, en plus de décrire à plusieurs échelles la dynamique spatio-temporelle des processus anoxiques apporte certains éléments explicatifs d'une vulnérabilité différentielle des différentes couches corticales.

2 Résultats

2.1 Article 1: Neuronal excitability and sensory responsiveness in the thalamo-cortical pathway in a novel rat model of isoelectric brain state

2.1.1 Rappel du contexte de la recherche

La première partie de ma thèse s'est inscrite dans la continuité de travaux réalisés au sein de mon laboratoire. Dans une série d'études menées sur un modèle d'état isoélectrique induit par un surdosage en barbituriques ainsi que chez des patients épileptiques, Tristan Altwegg-Boussac a pu montrer que cet état isoélectrique pharmacologique n'était pas associé à une abolition de l'excitabilité neuronale et de l'intégration sensorielle au sein du cortex somatosensoriel (chapitre 1.3.1; André-Obadia et coll., 2014; Kirshbaum et Carollo, 1970; Kroeger and Amzica, 2007). J'ai souhaité poursuivre ces recherches afin de déterminer si ce maintien des propriétés fonctionnelles des neurones et réseaux corticaux était retrouvé dans d'autres étiologies de l'état isoélectrique. J'ai donc développé un nouveau modèle d'état isoélectrique chez le rat induit cette fois par un surdosage en isoflurane, un éther halogéné volatil (chapitre 1.3.3.1). L'utilisation de cet agent anesthésique présente l'avantage d'avoir un contrôle précis des doses administrées et le maintien d'un état isoélectrique stable pour des périodes allant de quelques minutes à plusieurs heures. De plus, les cinétiques d'induction et d'élimination des éthers halogénés étant beaucoup plus rapides que les agents anesthésiques intraveineux, il est plus aisé de récupérer un état contrôle lors d'une diminution des doses d'anesthésie et ainsi examiner un éventuel impact à long-terme de l'état isoélectrique sur les propriétés fonctionnelles des neurones et réseaux corticaux. L'isoflurane a des mécanismes d'action ainsi que des cibles moléculaires différents des barbituriques et affecte différentes étapes de la transmission synaptique (chapitre 1.3.3.2). L'étude de ce nouveau modèle a donc permis d'évaluer l'impact sur les propriétés neuronales d'un état isoélectrique dont les mécanismes d'induction et les conséquences sur l'excitabilité cellulaire étaient différents de celui induit par les barbituriques.

J'ai réalisé des enregistrements simultanés *in vivo* des activités EEG et intracellulaires des neurones corticaux des couches profondes du cortex somatosensoriel primaire dans trois conditions électro-cérébrales successives : un état d'anesthésie légère dominé par des activités

lentes (voir chapitre 1.3.3.3), le silence électro-cérébral et un état nommé « récupération » correspondant au retour d'une activité EEG similaire à celle rencontrée au cours de la situation contrôle. J'ai pu évaluer dans les mêmes neurones corticaux, au cours de ces trois périodes, l'impact de ces changements de régime d'activité spontanée sur 1) les propriétés intégratives des neurones corticaux (la résistance d'entrée et la constante de temps membranaire), 2) leur excitabilité intrinsèque évaluée par la mesure de courant seuil et de gain neuronal, 3) les variations statistiques du taux et du profil temporel de leur décharge, 4) les propriétés des réponses sensorielles évoquées par la stimulation des vibrisses.

L'induction d'un état isoélectrique par les éthers halogénés a déjà été réalisée chez le chat *in vivo* (Ferron et coll., 2009; Kroeger et Amzica, 2007). Dans ce modèle, l'arrêt des activités électriques spontanées par une surdose d'isoflurane (> 2,5 %) était associé à une absence de réponse des neurones corticaux à des micro-stimulations somesthésiques. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus chez l'humain où des claquements de mains entraînaient des déflexions négatives dans l'EEG des patients en état isoélectrique induit par un isomère de l'isoflurane (Eger et coll., 1971). De plus, l'étude *in vitro* de réponses postsynaptiques évoquées par stimulations électriques des fibres afférentes ont montré la persistance de faibles réponses neuronales dans le cortex pour des dosages d'isoflurane similaires à ceux induisant un silence électro-cérébral *in vivo* (> 2 MAC) (Berg-Johnsen et Langmoen, 1986; El-Beheiry et Puil, 1989). J'ai choisi quant à moi d'appliquer des stimulations sensorielles reproductibles connues pour initier des potentiels postsynaptiques sub et supraliminaires dans les neurones corticaux somatosensoriels chez les rats (Mahon et Charpier, 2012). En comparant les réponses sensorielles EEG et intracellulaires induites dans les différents états cérébraux successifs, j'ai ainsi pu mettre en évidence une éventuelle altération de l'intégration sensorielle au cours de l'état isoélectrique et de la période de récupération. L'analyse des propriétés intégratives corticales m'a permis de mettre en relation les changements d'excitabilité et les modifications d'intégration sensorielle. J'ai également effectué des enregistrements extra et juxta-cellulaires des neurones thalamo-corticaux du noyau ventro-postéro médian (VPM), relais thalamiques de la voie lemniscale qui transmet les informations issues des vibrisses vers le cortex à tonneaux (Constantinople et Bruno, 2013; Petersen et Crochet, 2013). Cette approche multi-échelles, qui fait l'originalité de cette étude, a permis d'étudier l'impact de l'arrêt des activités spontanées par l'isoflurane sur le transfert des informations sensorielles dans la voie thalamo-corticale.

2.1.2 Matériel et Méthodes

2.1.2.1 Préparation des animaux et chirurgie

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives de l'Union Européenne (directive 2010/603/EU) et ont reçu l'accord conjoint du Ministère de la Recherche (APAFIS n° : 18003-201905101901) et du comité d'éthique Charles Darwin.

Les expériences ont été réalisées sur des rats Sprague-Dawley adultes des deux sexes. Les procédures de chirurgie ont été réalisées sur des animaux anesthésiés par inhalation d'isoflurane (3.5% ; Centravet). La trachée des animaux est ensuite canulée et ceux-ci placés dans un cadre stéréotaxique. Au cours des expériences, tous les points d'incision de contention sont localement infiltrés avec un anesthésique local, la lidocaïne (2%, Centravet). Le crâne des animaux est alors perforé au niveau du cortex à tonneaux (0,6–2.3 mm postérieur par rapport au bregma et 4,1–6 mm latéralement par rapport à la ligne médiane ; S1BF) et au-dessus du VPm (3,3 – 4 mm postérieur à bregma et 2,6 – 3 mm latéralement par rapport à la ligne médiane) (Paxinos et Watson, 2007). Pour assurer la stabilité des enregistrements, les animaux sont immobilisés à l'aide d'une injection intramusculaire d'un antagoniste de la jonction neuromusculaire (gallamine thriéthiodide, 40mg toutes les 2h ; Sigma-Aldrich) et placés sous ventilation artificielle (85 cycles par minute, 2.5 ml d'air ambiant par cycle). Une fois la chirurgie finalisée, les doses d'anesthésique gazeux étaient réduites à 0,75 – 1,5 % du volume inspiré.

Le rythme cardiaque et l'activité ECoG étaient enregistrés tout au long de l'expérience afin d'évaluer la profondeur de l'anesthésie. La saturation artérielle en oxygène (SpO₂) et la température corporelle (maintenue à 37°C par une couverture chauffante) étaient, elles-aussi, enregistrées tout au long de l'expérience afin d'assurer la stabilité des paramètres physiologiques des animaux (Altwegg-Boussac et coll., 2017). A la fin des expériences, une forte dose d'euthasol (40%) était injectée par voie intrapéritonéale. Une perfusion au paraformaldéhyde était ensuite réalisée pour permettre l'évaluation histologique des neurones enregistrés.

2.1.2.2 Délimitation des états cérébraux successifs

Le début de la période dite « contrôle » a été défini comme le moment à partir duquel l'activité ECoG de fond était dominée par des oscillations lentes (1–5 Hz) caractéristiques d'une anesthésie générale stable induite par l'isoflurane (Kroeger and Amzica, 2007; MacIver and

Bland, 2014; Purdon et coll., 2015). Après une période contrôle (4–90 min), l'état isoélectrique (3–46min) était induit grâce à une augmentation des doses d'isoflurane, de 0,75 – 1,5 % à 3,5 – 4 %. L'état isoélectrique était systématiquement précédé d'une période d'activité de type burst-suppression (B-S 1). Finalement, des doses d'isoflurane contrôles étaient rétablies, permettant l'émergence d'une seconde période de burst-suppression (B-S 2) suivie de la récupération de patrons d'activité ECoG similaires à ceux enregistrés en période contrôle. La mesure de l'amplitude du signal ECoG sur des durées supérieures ou égales à 1 min réalisée de manière conjointe avec l'analyse de son contenu fréquentiel a permis la confirmation de la récupération de l'état cérébral basal.

2.1.2.3 Enregistrements électrophysiologiques multi-échelles

L'activité ECoG était enregistrée via une électrode d'argent à basse impédance (~60 k Ω) placée sur la dure-mère au-dessus de S1BF et une électrode de référence placée sur le muscle de la tempe controlatérale. Les activités corticales de surface étaient amplifiées via un amplificateur à courant alternatif différentiel (modèle 1700 ; A-M Systems), filtrées entre 1 et 1000 Hz et digitalisées à 3 kHz (CEd 1401 Micro3 ; logiciel Spike2 version 7.20, Cambridge Electronic Design). Les enregistrements intracellulaires étaient réalisés en utilisant des micropipettes de verre remplies avec de l'acétate de potassium de concentration 2 M (50 – 90 M Ω). Les enregistrements en courant imposé étaient amplifiés avec un amplificateur Axoclamp 900A (Molecular Devices) en mode bridge, filtrés entre le DC et 10 kHz et digitalisés à 10 kHz. Les neurones pyramidaux enregistrés étaient identifiés par leur patron de décharge distinctifs, de type « regular spiking » (RS) ou « intrinsic bursting » (IB), en réponse à des stimulations directes supraliminaires (Steriade, 2004) et par leurs caractéristiques morphologiques. Les enregistrements extra ou juxta-cellulaires des neurones de relai du VPM étaient réalisés conjointement avec un enregistrement ECoG de S1BF, avec des micropipettes de verre remplies de chlorure de sodium à une concentration de 0.5 M (10 – 28 M Ω). Les enregistrements multi-unitaires étaient amplifiés avec un amplificateur Axoclamp 900A en mode bridge, filtrés entre 3 et 10 000 Hz et digitalisés à 10 kHz.

2.1.2.4 Stimulations sensorielles

Les stimuli sensoriels consistaient en des séries de « puffs » d'air délivrés via un capillaire de verre de 1mm de diamètre placé latéralement à 15 - 25 mm des moustaches de l'animal. Les puffs d'air (50 ms, 40 ou 50 psi), entraînant la déflexion de 4 à 8 moustaches d'environ 10

degrés, étaient appliqués à basse fréquence (0,5 Hz, 20 à 50 essais) afin de nous affranchir des phénomènes d'adaptation (Chung et coll., 2002). Au début de chaque expérience, l'orientation et l'intensité des puffs d'air étaient ajustées de façon à évoquer la plus grande réponse possible dans l'ECOG du S1BF controlatéral (Altwegg-Boussac et coll., 2017; Charpier et coll., 2020; Mahon and Charpier, 2012).

2.1.2.5 Analyse des signaux intracellulaires

Le potentiel de membrane moyen (V_m) et l'amplitude moyenne des fluctuations de potentiel membranaire (σV_m) étaient calculés à partir de la distribution des valeurs de V_m (la moyenne de la distribution et son écart-type). La fréquence de décharge moyenne et les valeurs de V_m ont été extraites à partir d'une période d'enregistrement stable d'au moins 1 min. Les propriétés des PAs étaient mesurées à partir de réponses à des échelons de courant ou lors de décharges spontanées. Le seuil de déclenchement des PAs des neurones corticaux était défini comme la valeur de V_m à partir de laquelle la pente de dépolarisation excédait 10 mV/ms (Mahon et Charpier, 2012). L'amplitude des PAs a été calculée comme la différence entre le seuil de déclenchement et la valeur de V_m au pic du PA, la durée totale de PA est le délai entre le franchissement du seuil de décharge et le retour à la même valeur de V_m .

Des échelons de courant hyperpolarisant (durée 200ms, $n > 10$) d'intensité croissante (-0.2 à -0.8 nA) étaient injectés dans les neurones corticaux afin de mesurer leur résistance membranaire (R_m). Les mesures de différences de voltage induites étaient réalisées juste après la charge de capacitance afin d'éviter toute interférence avec l'activation du courant I_H (Pape, 1996). La résistance membranaire moyenne était calculée à partir de la pente de la relation courant-voltage. Le coefficient de rectification était calculé comme le rapport des valeurs de R_m obtenues pour des échelons de -0,2 et -0,8 nA. Le coefficient quantifiant les effets membranaires de I_H (Sag ratio) correspondait au rapport (valeur d'hyperpolarisation stable) / (valeur maximale d'hyperpolarisation) calculé sur les réponses aux échelons de -0.8 nA. La constante de temps membranaire (τ_m) était extraite de la décroissance exponentielle du voltage lors de la phase initiale de l'hyperpolarisation induite par le courant d'intensité -0,4 nA.

La fonction de transfert des cellules pyramidales, c'est-à-dire le codage en taux de décharge des entrées excitatrices d'intensité croissante, était quantifiée dans tous les états cérébraux successifs (état contrôle, isoélectrique et récupération) comme la relation entre la fréquence de décharge évoquée et l'intensité du courant injecté. Le taux de décharge moyen était mesuré en réponse à des échelons de courant d'intensité croissante (200 ms, 0,1 – 2,7 nA, $n > 10$ essais par intensité, toutes les secondes). Des régressions linéaires étaient appliquées sur

la partie linéaire de la relation entrée-sortie afin d'extraire deux paramètres essentiels de l'excitabilité intrinsèque : le courant seuil de génération de PA (I_{Th}), interpolé comme l'intersection de la courbe et l'axe des abscisses, et le gain neuronal (γ), défini comme la pente de la relation (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Mahon and Charpier, 2012). Afin d'évaluer la régularité de la décharge spontanée et évoquée lors des différents états cérébraux, nous avons calculé le CV2 (coefficient de variation 2) car sa valeur est moins dépendante des variations du taux de décharge moyen que celle du CV (Holt et coll., 1996). En supposant que les PAs de la période ont lieu à l'instant t_i ($0 < i < n$), alors l'intervalle entre PA peut être défini comme $\Delta t_i = t_i - t_{i-1}$. Nous avons alors calculé le CV2 des intervalles avec : $CV2 = (2|\Delta t_{i+1} - \Delta t_i|) / (\Delta t_{i+1} + \Delta t_i)$ (Altwegg-Boussac et coll., 2014). Nous avons quantifié la variabilité du taux de décharge évoqué entre essais en appliquant la formule du facteur Fano (FF) (Teich, 1992). FF était calculé comme le rapport de la variance du taux de déchargé évoqué pour une intensité donnée et le taux de décharge moyen dans la série de stimulations (Altwegg-Boussac et coll., 2014).

La latence des réponses sensorielles intracellulaires était calculée comme la différence entre le début de la stimulation et le pied du potentiel postsynaptique dépolarisant (dPSP). L'amplitude des dPSP était mesurée comme la différence de voltage entre le pied et le pic de la dépolarisation tandis que la pente de dépolarisation était mesurée en approximant la dépolarisation initiale comme une ligne droite. La variabilité des amplitudes de dPSP était évaluée en mesurant l'écart-type (σ) des valeurs d'amplitude des essais fructueux.

2.1.2.6 Analyse des signaux ECoG et extracellulaires

L'analyse du contenu fréquentiel des signaux ECoG a été réalisée en appliquant des transformées de Fourier (FFT) sur des segments d'activité spontanée d'au moins 1 min. L'analyse fréquentielle au cours du temps des fluctuations ECoG illustrées par des cartes temps-fréquence (TF) a été réalisée en utilisant la technique des ondelettes (Altwegg-Boussac et coll., 2014). La latence des réponses sensorielles enregistrées dans l'ECoG (WERS) a été calculée, dans chaque état cérébral, comme étant la différence de temps entre le début du stimulus et le premier pic négatif de l'onde après un moyennage effectué sur un échantillon d'essais fructueux allant de 5 à 94 essais. L'amplitude moyenne des WERS a été mesurée comme la différence entre la valeur en voltage à la ligne de base prise 3 ms avant le début du stimulus et la valeur de potentiel mesurée au pic négatif de l'onde. La variabilité de l'amplitude des WERS a été évaluée en calculant l'écart-type sur des essais successifs. Les modifications d'amplitude et de

latence des WERs au cours du temps ont été évaluées en appliquant des stimuli répétés à une fréquence de 0.5 Hz.

Les enregistrements multi-unitaires réalisés dans le VPM ont été filtrés entre 500 et 2000 Hz afin d'en extraire les PAs. Les activités unitaires ont été extraites des signaux multi-unitaires en mesurant l'amplitude du premier pic dépolarisant des PAs. La fréquence de décharge spontanée des neurones thalamiques et la valeur de CV2 correspondante ont été calculées sur des périodes de 1 min durant chaque état cérébral. Les neurones ont été considérés comme répondant aux stimulations dès lors que la décharge suivant le stimulus était 2 fois supérieure à la fréquence de décharge basale. La probabilité de décharge des neurones, le nombre moyen de PAs évoqués et leur latence étaient évalués durant l'état contrôle et l'état isoélectrique.

2.1.2.7 Analyse statistique

Toutes les valeurs numériques sont données sous la forme : moyenne \pm SD. Les comparaisons entre groupes ont été réalisées en utilisant des tests de Student appariés ou non, des ANOVA mono-factorielles ou les tests non-paramétriques de Wilcoxon et Mann-Whitney (SigmaStat version 3.5). La significativité statistique était établie lorsque $P < 0,05$.

2.1.2.8 Marquage des neurones

Les neurones enregistrés intra et juxta-cellulairement étaient marqués par injection de neurobiotine (1,5% dans la solution de la pipette ; Vector Laboratories). Un marquage fiable des neurones enregistrés pouvait être réalisé par l'application d'échelons de courant dépolarisants (0,2 – 1 nA ; 300 ms) à une fréquence de 3 Hz pendant 10 à 20 min à la fin de la période d'enregistrement (Mahon et Charpier, 2012). Un protocole d'injection similaire nécessitant des intensités de courant plus grandes (2 – 5 nA) fut réalisé lors des enregistrements juxta-cellulaires et permettait un marquage fiable des neurones enregistrés (Williams et coll., 2020). Les animaux étaient ensuite rapidement sacrifiés à l'aide d'euthasol et une perfusion intracardiaque était réalisée avec une solution contenant 0,3 % glutaraldéhyde et 4 % paraformaldéhyde dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) (VWR chemicals).

2.1.3 Principaux résultats

Au cours du silence électro-cérébral, les neurones des couches profondes du S1BF avaient un potentiel membranaire plus hyperpolarisé qu'en contrôle et dénué de fluctuations synaptiques. Leur décharge spontanée était abolie mais leur résistance d'entrée était similaire à celle mesurée

durant les périodes contrôle en conséquence de la potentialisation par l'isoflurane des courant potassiques de fuite (Patel et coll., 1999) compensant l'augmentation attendue de résistance en lien avec l'abolition des conductances d'origine synaptique. L'induction de l'état isoélectrique entraînait une translation vers la droite de la fonction de transfert des neurones pyramidaux associée à une augmentation du courant seuil sans changement du gain neuronal. Lors de l'état isoélectrique, les neurones directement stimulés par des échelons de courant avaient une activité de décharge très régulière et invariable d'une stimulation à l'autre. Les réponses corticales à la déflexion des vibrisses étaient retardées et fortement atténuées en amplitude. Cette dépression des réponses sensorielles dans le cortex était corrélée à une réduction de la décharge évoquée dans les neurones thalamo-corticaux du VPM par la stimulation des vibrisses. Le rétablissement d'un dosage contrôle d'isoflurane entraînait un recouvrement progressif de l'amplitude et de la latence des réponses synaptiques des neurones et réseaux corticaux, suggérant une récupération analogue de la décharge thalamo-corticale. Mes résultats, mis en relation avec les études menées par Altwegg-Boussac et ses collaborateurs (2014, 2016, 2017), indiquent que l'excitabilité intrinsèque et l'intégration sensorielle au sein de la voie thalamo-corticale sont maintenues bien qu'atténuées dans différents cas de comas isoélectriques pharmacologiques. Ces données montrent qu'un même tracé EEG isoélectrique peut refléter un état fonctionnel différent des neurones et réseaux sous-jacents et questionnent encore davantage la vision « canonique » qui associe cet état extrême à une perte des fonctions cérébrales.



Neuronal excitability and sensory responsiveness in the thalamo-cortical network in a novel rat model of isoelectric brain state

Antoine Carton-Leclercq¹ , Sarah Lecas^{1,2}, Mario Chavez¹, Stéphane Charpier^{1,2} and Séverine Mahon¹

¹Institut du Cerveau, ICM, INSERM UMRS 1127, CNRS UMR 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

²Sorbonne University, UPMC Université Paris, Paris, France

Edited by: Ian Forsythe & David Wyllie

Key points

- The neuronal and network properties that persist during an isoelectric coma remain largely unknown.
- We developed a new *in vivo* rat model to assess cell excitability and sensory responsiveness in the thalamo-cortical pathway during an isoflurane-induced isoelectric brain state.
- The isoelectric electrocorticogram reflected a complete interruption of spontaneous synaptic and firing activities in cortical and thalamic neurons.
- Cell excitability and sensory responses in the thalamo-cortical network persisted at a reduced level in the isoelectric condition and returned to control values after resumption of background brain activity.
- These findings could lead to a reassessment of the functional status of the drug-induced isoelectric state: a latent state in which individual neurons and networks retain to some extent the ability of being activated by external inputs.

Abstract The neuronal and network properties that persist in an isoelectric brain completely deprived of spontaneous electrical activity remain largely unexplored. Here, we developed a new *in vivo* rat model to examine cell excitability and sensory responsiveness in somatosensory thalamo-cortical networks during the interruption of endogenous brain activity induced by high doses of isoflurane. Electrocorticograms (ECoGs) from the barrel cortex were captured simultaneously with either intracellular recordings of subjacent cortical pyramidal neurons or extracellular records of the related thalamo-cortical neurons. Isoelectric ECoG periods reflected the disappearance of spontaneous synaptic and firing activities in cortical and thalamic neurons. This was associated with a sustained membrane hyperpolarization and a reduced intrinsic excitability in deep-layer cortical neurons, without significant changes in their membrane input resistance. Concomitantly, we found that whisker-evoked potentials in the ECoG and synaptic responses in cortical neurons were attenuated in amplitude and increased in latency. Impaired responsiveness in the barrel cortex paralleled with a lowering of the sensory-induced firing in thalamic cells. The return of endogenous brain electrical activities, after reinstatement of a control isoflurane concentration,

After obtaining a bachelor's and a master's degree in neurosciences at Sorbonne Université (France), **Antoine Carton-Leclercq** started his PhD in 2018. His research aims at characterizing the functional properties of the isoelectric brain state. His strategy is to use multi-scale (from EEG to intracellular dynamics) *in vivo* recordings from rodent models and to transpose his findings/approaches to deep comatose human patients. He hopes to pursue a career in academic research and teaching in the future.



Stéphane Charpier and Séverine Mahon contributed equally to this work.

led to the recovery of cortical neurons excitability and sensory responsiveness. These findings demonstrate the persistence of a certain level of cell excitability and sensory integration in the isoelectric state and the full recovery of cortico-thalamic functions after restoration of internal cerebral activities.

(Received 1 June 2020; accepted after revision 21 October 2020; first published online 23 October 2020)

Corresponding author S. Mahon: Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, INSERM UMR51127, CNRS UMR 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France. Email: severine.mahon@upmc.fr

Introduction

Living brains – irrespective of the specie's phylogenetic position – possess the remarkable feature of endogenously generating electrical currents, which can be captured at the surface as continuously fluctuating electroencephalographic (EEG) waves (Caton, 1875; Bullock, 2003; Buzsáki *et al.* 2013). Background EEG activity in mammals mainly originates from the excitatory and inhibitory synaptic currents flowing within the cerebral cortex (Lopes da Silva, 1991; Buzsáki *et al.* 2012) and its spatiotemporal organization is thought to provide relevant information on the state of consciousness (Steriade, 2000). Active waking is thus characterized by fast (>10 Hz), and apparently desynchronized, small-amplitude EEG potentials, while the slow-wave or deep sleep, responsible for a physiological collapse of cognitive processes, is associated with large-amplitude low-frequency (0.5–4 Hz) EEG waves (Steriade, 2000; Destexhe *et al.* 2003; Neske 2016; Poulet & Crochet, 2019).

Comas, the most severe forms of altered consciousness, are also associated with specific EEG patterns which provide information about the patient's neurophysiological status and, possibly their prognosis (Hofmeijer & van Putten, 2016; Johnson & Kaplan, 2019). The most critical comatose state, which systematically correlates with an interruption of all conscious processes, is characterized by a continuous isoelectric EEG deprived of any physiologically relevant spontaneous events (Young, 2000; Husain, 2006; Altwegg-Boussac *et al.* 2017; Schramm *et al.* 2020). Such a prolonged flat-line EEG is generally irreversible when caused by an ischaemic encephalopathy, a traumatic head injury, a tumour or a long-lasting period of brain anoxia leading to brain death (Trojaborg & Jorgensen, 1973; Laureys, 2005; Husain, 2006; Schramm *et al.* 2020). However, a reversal can be obtained in the case of deep hypothermia (Stecker *et al.* 2001) and intoxication with elevated doses of CNS depressant medications (Bird & Plum, 1968; Kirshbaum & Carollo 1970; Ganes & Lunder, 1983; Chatrian *et al.* 1996), or when a cardio-respiratory resuscitation is rapidly initiated after a systemic anoxic period (Geocadin *et al.* 2002; Schramm *et al.* 2020). Hypothermia- or drug-related isoelectric EEG can be intentionally induced in patients

after a cardiac arrest or in case of hyper-refractory *status epilepticus* to reduce the deleterious consequences of oxygen deprivation and to stop the persistent seizure activity, respectively (Orlowski *et al.* 1984; Claassen *et al.* 2002; Silverman & Sciria, 2016; Altwegg-Boussac *et al.* 2017).

A continuous flat-line EEG is widely assumed to reflect a complete cessation of neuronal functions, leading to loss of external inputs processing. Our recent investigations have started to challenge this view by showing, in patients placed in a therapeutic coma (Altwegg-Boussac *et al.* 2017) and in rodents (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2016, 2017), that the suppression of on-going synaptic activity by high doses of barbiturate-derived compounds did not preclude the generation of multimodal sensory-evoked potentials in the EEG (Altwegg-Boussac *et al.* 2017). This was confirmed by means of intracellular recordings of rodent sensory cortex neurons, which demonstrated the persistence of current-evoked and synaptically induced firing responses in the isoelectric brain (Altwegg-Boussac *et al.* 2017). However, it remains to be established whether this preservation of certain cortical functions can be generalized to other forms of drug-induced isoelectric coma and whether the effects of the isoelectric state can be reversed when background synaptic activity is restored.

To further explore the neural properties that may persist in the absence of spontaneous activity, we developed a new *in vivo* rat pharmacological model in which the isoelectric state was induced by high doses of isoflurane, a halogenated ether with a wide spectrum of pre-synaptic and postsynaptic actions (Pocock & Richards, 1993; Campagna *et al.* 2003). High concentrations of isoflurane have previously proved to be effective in inducing a long-lasting flat-line EEG in humans (Eger *et al.* 1971) and in cats (Kroeger & Amzica, 2007; Kroeger *et al.* 2013), where they were shown to correlate with an abolition of cortical excitability (Kroeger & Amzica, 2007).

By combining ECoG monitoring from the barrel field of the primary somatosensory cortex (S1BF) with either intracellular recordings of subjacent pyramidal cortical cells or extracellular recordings from the corresponding thalamic nucleus, we demonstrated that deep-layer cortical neurons conserve their ability to be activated by input currents of high intensity in the isoflurane-induced

isoelectric state despite a sustained membrane hyperpolarization. We also showed that sensory responses, evoked in the ECoG and cortical neurons by the deflections of contralateral whiskers, had a decreased amplitude and an increased latency but exhibited less variability. The attenuation of cortical responsiveness was partly due to a lowering of sensory-induced firing in the somatotopically aligned thalamo-cortical neurons. Finally, the reversal of the electro-cerebral inactivity, upon restoration of a control concentration of isoflurane, led to the full recovery of cell excitability and sensory responses. These findings indicate that the maintenance in the isoelectric brain of some neuronal integrative properties, although at a reduced level, can be extended to different pharmacological conditions. They also suggest that such transient interruptions of cerebral activity do not necessarily lead to irreversible brain damage, at least for the duration of isoelectric periods investigated here.

Methods

Care and manipulation of animals were carried out in accordance with the guidelines of the European Union (directive 2010/603/EU) and received approval (APAFIS no. 18003-2019051019017280) from the French Ministry for Research and the *Charles Darwin* Ethical Committee on Animal Experimentation (C2EA-05). All the experimental procedures complied with *The Journal of Physiology's* policies on animal research (Drummond, 2009).

Animal preparation and surgery

Experiments were conducted *in vivo* on adult Sprague Dawley rats ($n = 34$) of both sexes (12 females and 22 males) (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). To perform surgery, animals were first anaesthetized by inhalation of isoflurane (3.5%; Centravet, Plancoët, France) using a compact anaesthesia unit (Minerve, Esternay, France), cannulated and placed in a stereotaxic frame. Incisions and pressure points were regularly infiltrated, throughout the experiment, with lidocaine (2%, Centravet). Small craniotomies were made above the left S1BF (0.6–2.3 mm posterior to bregma, 4.1–6 mm lateral to midline) and above the ipsilateral ventro-posterior medial nucleus (VPM) of the thalamus (3.3–4 mm posterior to bregma, 2.6–3 mm lateral to midline) (Paxinos & Watson, 1986). This allowed recordings of S1BF ECoG simultaneously with either intracellular (S1BF) or extracellular (VPM) neuronal activities. To enable long-lasting and stable recordings, rats were immobilized by intramuscular injection of a neuromuscular blocker (gallamine triethiodide, 40 mg (2 h)⁻¹; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and

artificially ventilated with room air (85 breaths min⁻¹, 2.6 ml cycle⁻¹). After completion of the surgical procedures, the dosage of inhaled isoflurane at the start of the recording session (control period) was reduced to 0.75–1.5% (see below).

Heart rate and ECoG activity were continuously recorded to assess the depth of anaesthesia. Oxygen saturation (SpO₂) and core temperature (maintained at 37°C by a feedback-controlled heating blanket) were also monitored to ensure the stability of physiological parameters (Altwegg-Boussac *et al.* 2017; Schramm *et al.* 2020). At the end of the experiments, animals were injected with an overdose of euthasol (40%, I.P.; Centravet) and perfused for subsequent histological evaluation of recorded neurons.

Delineation of the successive brain states

The beginning of the control recording session was defined as the time at which the ECoG pattern displayed a stable profile dominated by slow waves (1–5 Hz) (see Fig. 1B and C), as previously described in rats (MacIver & Bland, 2014), cats (Kroeger & Amzica, 2007) and humans (Purdon *et al.* 2015) anaesthetized with moderate doses of isoflurane. After a control period of 4–90 min ($n = 58$ protocols from 34 rats), an epoch of isoelectric ECoG, lasting from 3 to 46 min, was induced by increasing the concentration of isoflurane from 0.75–1.5% to 3.5–4%. The isoelectric brain state was systematically preceded by a transient period of burst-suppression activity pattern (B-S1). Finally, the isoflurane level was brought back to control values (0.75–1.5%), causing the return of a brief B-S profile (B-S2) followed by the recovery of an ECoG pattern similar to control periods. Measurements of peak-to-peak amplitude of ECoG signal on continuous records (≥ 1 min), complemented with the analysis of its frequency content, were used to assess the recovery of a control brain state (Fig. 1B and C).

Multi-scale electrophysiological recordings

ECoG activity was captured by means of a low impedance (~ 60 k Ω) silver electrode placed on the dura above S1BF, with a reference electrode apposed on a temporal muscle of the opposite side of the head. Surface cortical signals were amplified by a differential AC amplifier (Model 1700; A-M Systems, Sequim, WA, USA), filtered between 1 Hz and 1 kHz, and digitized at 3 kHz (CED 1401 Micro3; Spike2 software version 7.20, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) for off-line analysis. Intracellular recordings, performed using glass micropipettes filled with 2 M potassium acetate (50–90 M Ω), were obtained from cortical neurons ($n = 36$ from 24 rats) located in the layers 5–6 of S1BF at depths ranging from

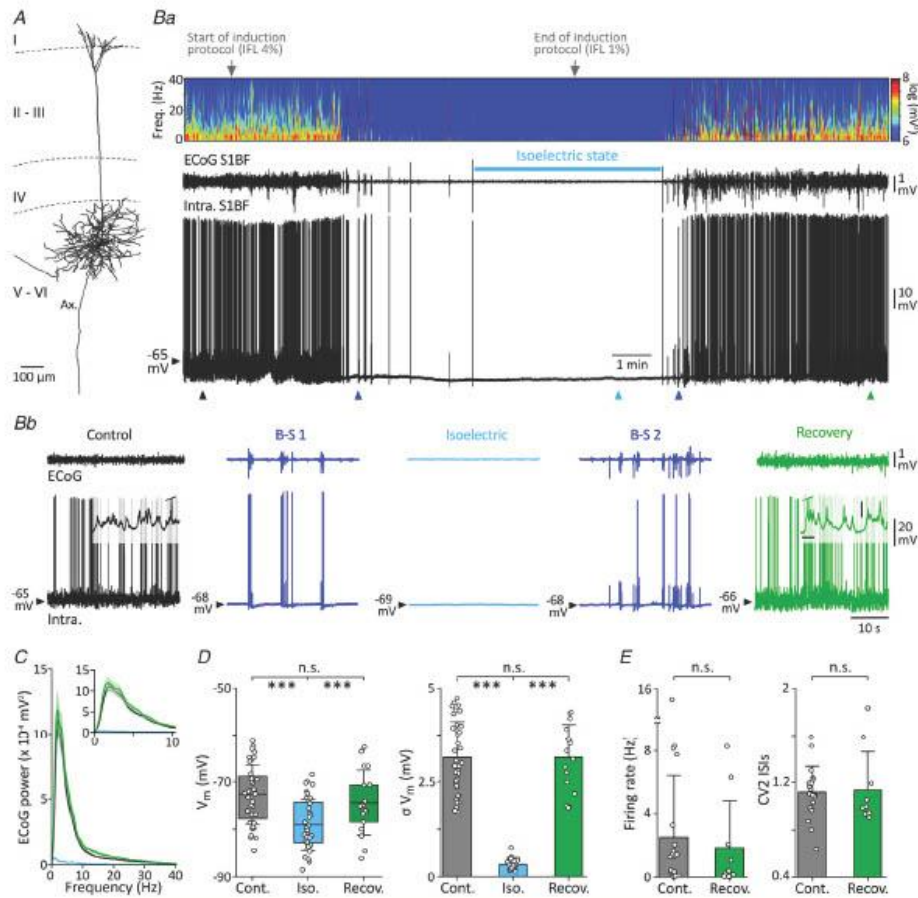


Figure 1. Dynamic changes in ECoG pattern and cortical neurons intracellular activity from induction of the isoelectric state to recovery of brain activity

A, reconstruction of a S1BF pyramidal neuron filled with neurobiotin (from 50- μ m thick whole mounts). The cortical layers are delimited by the dashed lines. Ax., axon. **Ba**, continuous simultaneous recordings of S1BF ECoG (middle) and intracellular activity from a subadjacent pyramidal cell (bottom, same cell as in **A**) in control condition, during the induction of the isoelectric state and the recovery of cortical activity after restoration of a control level of isoflurane. The two grey arrows respectively mark the beginning (IFL 4%) and the end (IFL 1%) of the isoelectric state induction period. The time-frequency map of the ECoG signal, computed throughout the recording session (top), illustrates the collapse of ECoG frequency content during the isoelectric period. **Bb**, expanded segments of the paired records in **Ba** at the indicated colour-coded periods, during control condition (Control), the B-S pattern following the beginning of the induction period (B-S1), the isoelectric state (Isoelectric), the B-S activity following the reinstatement of a control isoflurane concentration (B-S2) and after full restoration of ECoG and intracellular activities (Recovery). The insets in control and recovery states show enlargements of background synaptic activity (calibrations: 10 mV, 200 ms; APs are truncated). **C**, average ECoG power spectrum computed from 16 protocols during control (black), isoelectric (blue) and recovery (green) brain states. The expansion of the 0–10 Hz frequency range (inset) shows that control (Cont.) and recovery (Recov.) power spectra closely overlapped. **D** and **E**, population data showing the mean V_m (**D**, left), the amplitude of V_m fluctuations (σV_m) (**D**, right), the spontaneous firing rate (**E**, left) and the regularity of discharge (CV2 ISIs) (**E**, right) during control, isoelectric and recovery states. In the box plots, central bars are means, whiskers represent SD and boxes indicate interquartile range. Here and in all following figures, bar plots show means \pm SD. Open circles correspond to individual cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., non-significant.

884 to 2719 μm below the cortical surface (Paxinos & Watson, 1986; Wilent & Contreras, 2004). Current-clamp recordings were amplified with an Axoclamp 900A amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA) operating in bridge mode, band pass filtered between DC and 30 kHz, and digitized at 10 kHz. Recorded cortical neurons were identified on-line as pyramidal cells on the basis of their distinctive intrinsic firing patterns in response to direct stimulations, i.e. either regular spiking (RS) (Fig. 3A) or intrinsic bursting (IB) (Steriade, 2004), and off-line by their morphological features (Figs 1A and 5A).

In a subset of experiments ($n = 22$ protocols from 10 rats), extracellular or juxta-cellular recordings from VPM thalamic relay neurons (4.1–6.4 mm below the cortical surface) were performed, in conjunction with S1BF ECoG monitoring, using glass micropipettes filled with 0.5 M NaCl (10–28 M Ω). Single- and double-unit recordings were amplified with an Axoclamp 900A amplifier operating in bridge mode, filtered at 3 Hz–10 kHz, and digitized at 10 kHz.

Sensory simulations

Sensory stimuli consisted of puffs of compressed air, generated by a pressure device (Picospritzer III, Intracel Ltd, Saint Ives, UK) and delivered to the whiskers through a 1 mm diameter glass pipette placed 15–25 mm rostro-lateral from the mystacial pad. Square air puffs (50 ms, 40 or 50 psi), which deflected on average 4–8 whiskers by ~ 10 deg, were applied with a low frequency (0.5 Hz, 20–50 trials) to prevent adaptation of sensory-evoked responses (Chung *et al.* 2002). In each experiment, the orientation and intensity of air puffs were adjusted during the control period to produce the largest whisker-evoked response (WER) in the contralateral S1BF ECoG, and then kept constant throughout the recording session (Mahon & Charpier, 2012; Altwegg-Boussac *et al.* 2017; Charpier *et al.* 2020).

Analysis of electrophysiological signals

Intracellular records. Average membrane potential (V_m) of cortical neurons was calculated as the mean of the distribution of spontaneous subthreshold neuronal activity and the magnitude of V_m fluctuations was quantified as the standard deviation (σ) of the distribution (σV_m). Mean spontaneous firing rate and V_m values were extracted from recordings of at least 1 min. Action potentials (APs) properties were measured either from current-evoked responses or from the spontaneously generated discharge. Voltage threshold of APs in cortical neurons was defined as the V_m at which the $dV_m dt^{-1}$ first exceeded 10 mV ms $^{-1}$ (Mahon & Charpier, 2012). APs

amplitude was calculated from threshold to peak potential and their total duration was the time between voltage threshold and the return to the same V_m value.

Repetitive current pulses (200 ms duration, repeated every 1 s, $n \geq 10$ trials per intensity) of increasing intensity (from -0.2 to -0.8 nA) were injected into cortical cells to measure membrane resistance (R_m). Measurements of voltage drops (averaged for each tested intensity) were made at the end of the membrane capacitance charge to avoid interference with a possible depolarizing sag (see Fig. 2B), indicative of the activation of the hyperpolarization-activated cationic current I_h (Pape, 1996). Corresponding voltage-current (V - I) plots were constructed and the mean R_m was calculated as the slope of the linear portion of the V - I plot. The rectification ratio (RR), an index of a voltage-dependent modulation of R_m , was defined as the ratio between R_m values in response to current pulses of -0.2 nA and -0.8 nA. The sag ratio (SR), quantifying the membrane effect of I_h , corresponded to (steady hyperpolarization value)/(peak hyperpolarization value) calculated from current pulses of -0.8 nA. In a subset of neurons ($n = 6$), to estimate the time-dependent changes of R_m from control condition to the isoelectric state, a series of current pulses of uniform intensity (-0.4 nA, 200 ms) were given at 1 Hz. The membrane time constant (τ_m) was derived from an exponential decay fit applied to the initial phase of the mean ($n > 10$ successive trials) current-induced (-0.4 nA) hyperpolarization (Fig. 2A, left), and quantified using the linear cable theory of neuronal membrane (Jack *et al.* 1975) (Fig. 2A, inset).

The transfer function of cortical pyramidal cells, i.e. the rate-coded output firing as a function of excitatory inputs of increasing magnitude, was quantified in the three successive brain states (control, isoelectric and recovery) as the relation between the intensity of intracellularly injected currents and the mean evoked AP frequency (F - I relationship). The mean firing rate was measured in response to depolarizing current pulses of increasing intensity (200 ms, 0.1–2.7 nA, $n \geq 10$ trials per intensity) applied at 1 Hz. Linear regressions were applied to F - I curves to extract two main parameters of intrinsic excitability: the threshold current for AP generation (I_{th}), extrapolated as the x -intercept of the linear fit, and the neuronal gain (γ), defined as the slope of the linear portion of F - I curves (Mahon & Charpier, 2012; Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2017). To assess the regularity of spontaneous and current-evoked firing in the different brain states, we used the CV2 method, which is less dependent on variations in average firing rates (Holt *et al.* 1996). Assuming that APs in a train occur at times t_i ($0 < i < N$), the inter-spike-interval (ISI) can be defined as: $\Delta t_i = t_i - t_{i-1}$. We then calculated the CV2 of ISIs using the following equation: $CV2 = (2|\Delta t_{i+1} - \Delta t_i|) / (\Delta t_{i+1} + \Delta t_i)$ (Altwegg-Boussac *et al.* 2014). We also quantified the

trial-to-trial variability in the number of current-evoked APs by applying the Fano factor (FF) method (Teich, 1992). FF was calculated as the variance of the number of evoked APs, for a current intensity causing an equivalent mean firing rate in the three brain states, divided by the corresponding mean number of APs generated during the series of stimulations (Altwegg-Boussac *et al.* 2014).

The latency of intracellular sensory responses was calculated as the time between the onset of the air-puff and the beginning of the depolarizing postsynaptic potential (dPSP). dPSP amplitude was measured from the foot potential to the peak depolarization and their rising slope was quantified by approximating the foot-to-peak depolarization as a straight line. The variability of

dPSP amplitude was assessed by measuring the standard deviation (σ) value across successive trials.

ECoG and extracellular signals. The frequency distribution of ECoG signals was generated by applying fast Fourier transforms (FFT) to segments of records of at least 1 min. The spectral content of ECoG waveforms over time, illustrated by time-frequency (TF) maps, was further quantified using wavelet transform analysis performed with custom-written functions in Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), as previously described (Schramm *et al.* 2020).

Latency of WERs in the ECoG was calculated, in each brain state, as the time between stimulus onset and the

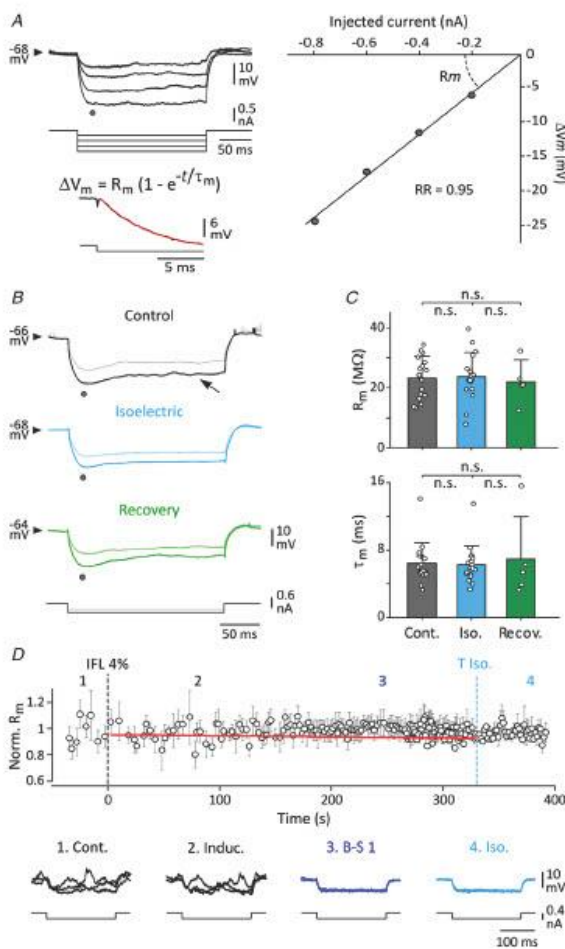


Figure 2. Stability of resting integrative properties of cortical neurons

A, measurement of neuronal integrative properties. Left, average voltage responses ($n = 7-25$ trials) of a 51BF pyramidal neuron in control condition (top records) to negative current pulses of increasing intensity (bottom traces). The current-induced V_m deflections were measured at the time indicated by the black dot under the traces, to avoid any contamination by the subsequent 'sag' potential (oblique arrow in *B*). The bottom trace is an expansion of the early part of the V_m change (ΔV_m) in response to a -0.4 nA current pulse. The value of τ_m (6 ms) was extracted from the exponential decay function equation fitted (red curve) to the V_m deflection. Right, the $V-I$ relationship was best fitted by a linear regression ($r^2 > 0.99$), with a RR close to 1. In this neuron, the R_m extrapolated from the slope of the ohmic relation was 14 M Ω . **B**, current-evoked average (5-69 trials) voltage responses in another cortical neuron illustrating the stability of R_m and τ_m in the three brain states. **C**, summary data of R_m and τ_m values measured in the different conditions: control (Cont., $n = 17$ neurons), isoelectric state (Iso, $n = 17$ neurons) and recovery (Recov., $n = 5$ neurons). **D**, time course of R_m values in control, after the onset of the induction protocol (black dashed line, IFL 4%), and up to the establishment of the electro-cerebral inactivity (blue dashed line, T Iso.). Each circle corresponds to the mean (\pm SEM) R_m calculated from 6 neurons in response to current pulses of -0.4 nA (200 ms, every 1 s) after normalization to the corresponding control values. During B-S1, R_m measurements were restricted to silent periods. The linear fit ($r^2 = 0.006$, $P = 0.03$) of R_m values along the induction process (red line) indicated a very slow decline of R_m over time, which did not result in a significant R_m change when the isoelectric state was reached. Traces below are examples of superimposed ($n = 3$) cell responses obtained at the indicated times in control (Cont.), just after induction (Induc.), during the burst-suppression epoch (B-S1) and at the establishment of the electro-cerebral inactivity (Iso.). n.s., non-significant. A, B and D (bottom records) are from three different neurons.

peak of the first downward wave after averaging of 5–94 stimuli. Their mean amplitude was the voltage difference between the baseline voltage value measured 3 ms before stimulus onset and the potential at the peak of the first downward wave. Variability of WERs amplitude was assessed by measuring the σ value across successive trials. Time-dependent changes in WER amplitude and latency were examined by applying repetitive sensory stimuli at 0.5 Hz.

Single and double extracellular cell recordings from the VPM nucleus were band-pass filtered (500 Hz–2 kHz) to extract AP waveforms from the raw signal. Single units ($n = 18$) were isolated from multi-unit recordings ($n = 4$) using the amplitude of the first depolarizing peak of the AP waveform as a discriminative criterion (Fig. 6Cb, inset). Mean spontaneous firing rate of thalamic cells, and the corresponding values of CV2 ISIs, were calculated over 1-min periods in each brain state. Units were considered as exhibiting clear-cut responses to sensory stimulations if the number of evoked APs in the 50-ms period following the stimulus was equal or superior to 2 times the mean baseline AP count. The firing probability, average number of APs per sensory stimulations and latency of evoked APs (measured from air-puffs onset) were computed during control state and the electro-cerebral inactivity.

Statistical analysis

Numerical values are given as means \pm SD, unless stated otherwise. Differences between groups were assessed using Student's paired and unpaired two-tailed *t* tests, one-way ANOVA, or the non-parametric Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney rank sum test when appropriate (SigmaStat version 3.5, Systat Software, Chicago, IL, USA). Significance was defined as $P < 0.05$.

Neuron staining

Intra- and juxta-cellularly recorded neurons were labelled by injection of neurobiotin (1.5% added to pipette solutions; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A reliable labelling of intra-cellularly recorded neurons was achieved by means of repeated injection of depolarizing current pulses (0.2–1 nA; 300 ms) applied at 3 Hz during 10–20 min at the end of the recording session (Mahon & Charpier, 2012). A similar injection protocol, using greater current intensities (2–5 nA) granted a reliable labelling of the juxta-cellularly recorded cells (Williams *et al.* 2020). Rats were then rapidly killed with euthasol and transcardially perfused with a fixative solution containing 0.3% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (0.1 M, pH 7.4) (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France). The histochemical methods used to reveal

the morphology of neurobiotin-filled neurons have been previously described in detail (Williams *et al.* 2016).

Results

Cortical changes from the induction of the isoelectric state to the recovery of brain activity

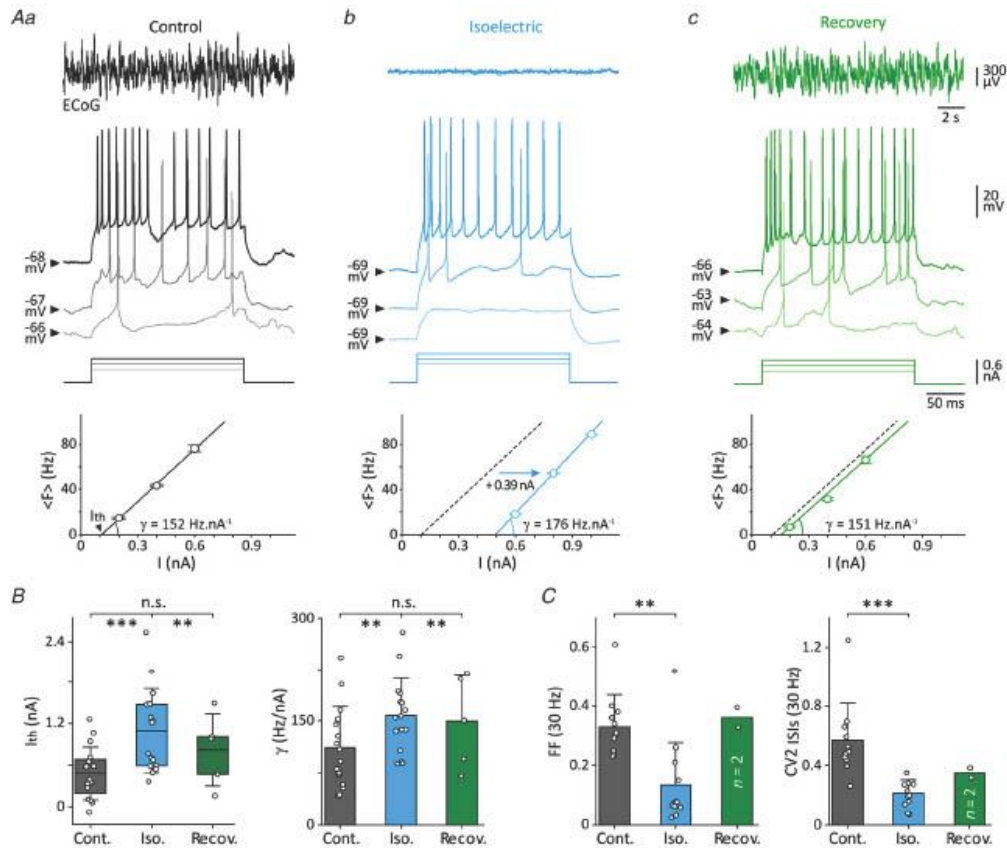
We obtained *in vivo* intracellular recordings from deep-layer S1BF neurons simultaneously with the corresponding ECoG ($n = 36$ paired recordings from 23 rats) (Fig. 1A and B). Neuronal location in layers 5–6 was confirmed by subsequent histological analysis of the labelled cells ($n = 17$) (Figs 1A and 5A), which revealed a morphology characteristic of the large-size deep-layer pyramidal neurons of the barrel cortex (Manns *et al.* 2004; Pidoux *et al.* 2011; Mahon & Charpier, 2012). Consistent with this anatomical identification, recorded cells displayed either a regular spiking (RS, $n = 31$) (Fig. 3A) or an intrinsic bursting (IB, $n = 5$) pattern in response to the injection of suprathreshold current pulses, the two main firing profiles of cortical pyramidal neurons (Zhu & Connors, 1999; Mahon & Charpier 2012).

As previously described in rodents (White *et al.* 1974; MacIver & Bland, 2014), when isoflurane concentration was set in control conditions at 0.75–1.5% ($n = 58$ control sessions from 34 rats), the ECoG displayed an intense background activity dominated by rhythmic waves of fluctuating amplitude (Figs 1B and 3Aa). As demonstrated by TF maps (Fig. 1Ba, top panel) and spectral analysis (Fig. 1C), control ECoG activity was quite stationary and limited to the 1–5 Hz frequency band. In agreement with this rhythmic cortical pattern, the intracellular activity of cortical neurons was characterized by recurring synaptic depolarizations (Fig. 1Bb, Control), resulting in a highly fluctuating V_m ($\sigma V_m = 3.1 \pm 1.0$ mV, from 1.7 to 4.7 mV, $n = 36$ neurons) (Fig. 1Bb, Control and D, right). The corresponding mean V_m exhibited a high cell-to-cell variability (from -84.4 to -61.4 mV, $n = 36$ neurons, with an average value of -72.6 ± 6.2 mV ($n = 36$ neurons) (Fig. 1D, left). This background synaptic activity caused a relatively irregular spontaneous firing in 22 of the 36 recorded neurons (from 0.1 to 15.3 Hz, mean = 2.5 ± 3.9 Hz, $n = 22$ neurons) (Fig. 1Ba and Bb, Control), as attested by the large values of CV2 ISIs (1.1 ± 0.3 , from 0.6 to 1.6, $n = 22$ neurons). This intracellular activity pattern of S1BF pyramidal neurons was consistent with previous reports from sensory cortices of various species undergoing comparable regimens of isoflurane (Aasebø *et al.* 2017; Aksenov *et al.* 2019; Ferron *et al.* 2009).

After a control recording period (mean = 23.3 ± 16.2 min, $n = 58$ protocols from 34 rats), an isoelectric state was induced by augmenting the

doses of inhaled isoflurane to 3.5–4%. The ECoG activity progressively slowed down (Fig. 1Ba, top record) and was replaced, 1–3 min after the beginning of the induction, by a B-S activity pattern characterized by periods of large amplitude wave bursts interrupted by electrical silences (Fig. 1Ba and Bb, B-S1). These ECoG bursts were

reflected in pyramidal neurons by episodes of membrane depolarizations giving rise to multiple APs firing (Fig. 1Bb, B-S1, bottom record). This ECoG-intracellular pattern was very similar to that previously described in the cat parietal cortices during isoflurane-induced B-S activity (Kroeger & Amzica, 2007; Ferron *et al.* 2009).



Over time, the suppression periods became increasingly longer until the establishment, 5.4 ± 2 min (from 2.4–10.7 min, $n = 58$ protocols) after induction onset, of a continuous isoelectric line in the ECoG record (Fig. 1Ba and Bb, Isoelectric) associated with a complete collapse of its frequency components (Fig. 1Ba, top and C). The latency required to instate the electro-cerebral inactivity was inversely correlated with the level of isoflurane at the time of the induction (IFL 4%: 5.1 ± 2.0 min, $n = 44$ protocols; IFL 3.5%: 6.6 ± 1.9 min, $n = 14$ protocols; $P = 0.004$). The electrically silent ECoG correlated with a complete lack of detectable synaptic events and spontaneous firing in the subjacent pyramidal cells (Fig. 1Ba and Bb, Isoelectric), as previously demonstrated during isoflurane- (Kroeger & Amzica, 2007; Kroeger *et al.* 2013) and barbiturate-induced (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2016, 2017) isoelectric brain states. The corresponding mean V_m (Iso. $V_m = -79.1 \pm 5.4$ mV, $n = 36$ neurons from 23 rats) was significantly hyperpolarized compared to control condition ($P < 0.001$) (Fig. 1D, left), together with a dramatic reduction of V_m fluctuations (Iso. $\sigma V_m = 0.33 \pm 0.12$ mV, $n = 36$ neurons; $P < 0.001$) (Fig. 1D, right). These changes in V_m and σV_m values did not correlate with the time spent in the silent condition ($r^2 < 0.03$). The establishment of the isoelectric state was also accompanied by a lowering of the animals' heart rate ($P < 0.001$), whereas SpO₂ values remained stable ($P = 0.18$).

In 49 (out of 58) experiments ($n = 29$ rats), 5–38 min (mean = 13.7 ± 7.4 min) after the induction onset, the level of isoflurane was returned to the corresponding control value (0.75–1.5%). After the persistence of a flat line ECoG for a period of 1–4 min (mean = 2.2 ± 0.6 min, $n = 49$ protocols), a B-S pattern resurfaced (Fig. 1Ba and Bb, B-S2), with an inverse temporal profile compared to B-S1. Thus, suppression epochs rapidly shortened over time, giving way to a continuously active ECoG (Fig. 1Ba). A full recovery of ECoG activity, including peak-to-peak amplitude (Cont. ECoG ampl. = 645 ± 231 μ V; Recov. ECoG ampl. = 646 ± 234 μ V, $n = 49$ protocols; $P = 0.09$) (Fig. 1Ba and Bb) and frequency content (Fig. 1C), was obtained 9.3 ± 2.3 min (from 5.5 to 16.0 min, $n = 49$ protocols) after the return to the control levels of isoflurane (Fig. 1Ba, Bb and F). The speed of ECoG activity recovery was found to be independent on the time spent in the isoelectric condition ($r^2 = 0.05$). Changes in the intracellular activity of simultaneously recorded cortical neurons closely paralleled the recovery of activity at cortical surface. Periods of isoelectric V_m alternating with surges of suprathreshold rhythmic depolarizations during B-S2 (Fig. 1Bb, B-S2) were followed by the restoration of a continuous background synaptic activity along with the regaining of an active ECoG pattern. At the time of ECoG full recovery, the average V_m value (-74.4 ± 6.8 mV, $n = 17$ neurons from 13 rats) and the amplitude of V_m

fluctuations ($\sigma V_m = 3.1 \pm 0.9$ mV, $n = 17$ neurons) in S1BF pyramidal neurons were similar to those calculated in control ($P \geq 0.08$ for each parameter) (Fig. 1D). This was accompanied by a return to control values of the firing rate (Recov. mean firing rate = 1.9 ± 2.9 Hz, $n = 10$ neurons; $P = 0.6$) and regularity (Recov. CV2 ISIs = 1.14 ± 0.31 , $n = 10$ neurons; $P = 0.4$) (Fig. 1E). Along with this regaining of cortical activity, the heart rate recovered values analogous to those measured before brain silencing (Cont. heart rate = 407 ± 43 bpm, $n = 58$ protocols; Recov. heart rate = 403 ± 38 bpm, $n = 49$ protocols; $P = 0.56$).

In summary, the isoelectric state, as well as the subsequent recovery of spontaneous activity, were both preceded by an episode of B-S. The intracellular activity of cortical neurons strictly followed the ECoG changes, presenting a sustained hyperpolarization associated with the disappearance of synaptic and firing events during the electro-cerebral inactivity, and a full recovery of control patterns of activity after restoration of pre-induction levels of isoflurane.

Integrative properties and transfer function of cortical neurons from electro-cerebral silence to recovery of brain activity

We next investigated how resting integrative properties of S1BF pyramidal neurons, i.e. their ability to process membrane currents, and $F-I$ relationships were affected during the period of electro-cerebral inactivity and the subsequent period of recovery. We first analysed R_m and τ_m , two membrane parameters which respectively govern the ability of synaptic currents to displace V_m and the efficacy with which a neuron summates synaptic potentials in time. R_m was quantified, in the different brain states, as the slope of the linear fits of the $V-I$ relations (Fig. 2A and B). Because a hyperpolarization-induced depolarizing V_m 'sag' indicative of the activation of I_h (Pape, 1996) could be observed in some neurons (Fig. 2B), voltage deflections in response to negative current pulses were measured at the end of the membrane capacitance charge (Fig. 2A and B, black dots). The mean R_m value, computed over the whole set of tested neurons, did not significantly differ between the different periods (Cont. $R_m = 23.3 \pm 7.0$ M Ω , $n = 17$ neurons; Iso. $R_m = 23.8 \pm 7.7$ M Ω , $n = 17$ neurons; Recov. $R_m = 21.9 \pm 7.1$ M Ω , $n = 5$ neurons; $P > 0.06$ for each paired comparison) (Fig. 2B and C, top). Membrane rectification was also not affected, as evidenced by the stability of RR values which remained close to 1 regardless of the brain state considered (Fig. 2A). The sag ratio was found to be smaller in control conditions (0.78 ± 0.15 , $n = 17$ neurons) compared to the isoelectric state (0.93 ± 0.08 , $n = 17$ neurons; $P < 0.001$), and to

regain its control value after recovery of brain activity ($n = 5$ neurons; $P = 0.1$). As expected from the overall constancy of R_m measurements, τ_m values were similar in the different brain states (Cont. $\tau_m = 6.4 \pm 2.4$ ms, $n = 17$ neurons; Iso. $\tau_m = 6.4 \pm 2.2$ ms, $n = 17$ neurons; Recov. $\tau_m = 6.9 \pm 5.0$ ms, $n = 5$ neurons; $P > 0.05$ for each paired comparison) (Fig. 2C, bottom).

Although passive neuronal integrative properties remained globally unaffected between the separate brain states, R_m could have experienced time-dependent changes in the course of the induction process, as this membrane parameter was previously found to be unstable, augmenting or decreasing, in cat cortical neurons in response to increasing levels of isoflurane (Ferron *et al.* 2009). In six neurons ($n = 4$ rats), we thus further examined the continuous variations of R_m , from control state to the establishment of the electro-cerebral silence, by measuring the V_m drops in response to iterative injection of negative current pulses (-0.4 nA, 200 ms, every 1 s). During the course of the B-S pattern following the induction procedure, quantification of R_m was restricted to the silent periods. As illustrated in Fig. 2D, the temporal evolution of R_m showed a relative constancy. On average, R_m values normalized with respect to the control condition were found to decrease by $0.5\% \text{ min}^{-1}$, corresponding to a reduction of $0.02 \text{ M}\Omega \text{ min}^{-1}$. In this set of experiments, R_m values measured after the entry into the isoelectric state did not significantly differ from those calculated in control ($P = 0.39$), further demonstrating the stability of this cell parameter in the two conditions.

We next searched for potential changes in membrane excitability and transfer function of S1BF cortical neurons during the isoflurane-induced isoelectric periods. $F-I$ curves, generated by injection of positive current pulses of increasing intensity (Fig. 3A), were found to be shifted to the right during brain silencing, leading to a significant increase in current threshold values (Cont. $I_{th} = 0.48 \pm 0.38$ nA, $n = 16$ neurons; Iso. $I_{th} = 1.10 \pm 0.61$ nA, $n = 16$ neurons; $P < 0.001$) (Fig. 3Aa, Ab and B, left). This was accompanied by an augmentation of the neuronal gain. The slope of $F-I$ curves, despite a high cell-to-cell variability, became on average steeper compared to control state (Cont. $\gamma = 111.4 \pm 58.6 \text{ Hz nA}^{-1}$; Iso. $\gamma = 157.8 \pm 53.7 \text{ Hz nA}^{-1}$, $n = 16$ neurons; $P = 0.008$) (Fig. 3Aa, Ab and B, right), corresponding to a mean firing increase of 46.4 Hz nA^{-1} . Both $F-I$ parameters recovered their control values during the regaining of a sustained background activity (Recov. $I_{th} = 0.82 \pm 0.52$ nA; Recov. $\gamma = 149.3 \pm 66.4 \text{ Hz nA}^{-1}$, $n = 5$ neurons; $P > 0.09$ for both parameters) (Fig. 3Ac and B). In a subset of cells ($n = 7$), we examined the impact of the level of membrane polarization on the lateral shift of the transfer function during the isoelectric state by artificially manipulating the V_m . We injected, in the iso-

electric condition, a depolarizing DC current in order to bring cells to a V_m (Iso.+IDC $V_m = -73.8 \pm 3.7$ mV, $n = 7$ neurons) close to that measured in control ($P = 0.61$). This led to a significant reduction in I_{th} values (Iso. $I_{th} = 0.9 \pm 0.5$ nA; Iso.+IDC $I_{th} = 0.44 \pm 0.29$ nA, $n = 7$ neurons; $P = 0.012$) which became similar to those previously measured in control ($P = 0.42$). The neuronal gain was not affected by the depolarization and remained augmented ($P = 0.008$).

The elevated current threshold values in absence of synaptic noise were not accompanied by significant modifications in AP properties. To avoid any short-term modulation of pyramidal neurons firing characteristics by prior activity (Henze & Buzsáki, 2001), APs parameters were measured from the first-generated AP elicited by near-threshold current pulses ($n = 10$ RS neurons). AP amplitude (Cont. = 62.7 ± 3.1 mV; Iso. = 62.3 ± 2.9 mV, $P = 0.9$), duration (Cont. = 1.3 ± 0.3 ms; Iso. = 1.3 ± 0.3 , $P = 0.8$) and voltage threshold (Cont. = -52.4 ± 2.8 mV; Iso. = -50.8 ± 2.1 mV, $P = 0.05$) were almost identical between the two conditions. AP properties during recovery periods were also similar to those measured in control ($P \geq 0.25$ for each comparison). These findings indicated that the ionic mechanisms subtending the intrinsic generation of APs, including the properties of voltage-gated channels, were not modified by the transient interruption of spontaneous neuronal and synaptic activities.

We next sought to determine whether the suppression of background synaptic activity altered the reliability and temporal pattern of firing responses to repeated injection of current pulses. The reliability of AP counts was assessed by quantifying the FF and the regularity of firing pattern by the computation of the CV2 ISIs (see Methods). Measurements were made for stimulation intensities that elicited in the recorded neurons a similar mean firing rate (~ 30 Hz) in the different brain states ($n = 12$). The mean FF value, which was 0.33 ± 0.11 ($n = 12$ neurons) in control, dropped to 0.13 ± 0.14 ($n = 12$ neurons) after the removal of spontaneous activity ($P = 0.003$) (Fig. 3C, left). In the two neurons that could be tested during brain recovery, FF measurements regained values close to their control level (Cont. FF = 0.34 and 0.31; Recov. FF = 0.39 and 0.33). In the same set of cells, the average control CV2 value (0.57 ± 0.25 , $n = 12$ neurons) fell to 0.21 ± 0.10 ($n = 12$ neurons; $P < 0.001$) during the isoelectric state (Fig. 3C, right). The firing regularity of the two neurons examined remained slightly increased (Recov. CV2 ISIs = 0.3 and 0.38) after the return of spontaneous activity.

Altogether these findings indicate that the isoflurane-induced isoelectric brain state and associated neuronal hyperpolarization did not affect the resting integrative properties of cortical neurons. The ease with which a threshold current could initiate APs was lessened,

but the augmented neuronal gain values suggested an amplification of the effects of large excitatory inputs on cell firing. Both the reliability and regularity of firing patterns were enhanced in the absence of background electrical activity. The neuronal parameters affected by the brain silencing recovered to control values upon restoration of spontaneous activity.

Alteration and recovery of sensory responsiveness in the somatosensory cortex

We found that the interruption of on-going electrical brain activities, induced by the administration of high doses of isoflurane, caused a number of alterations in S1BF neurons that may affect their responsiveness to synaptic inputs. To determine whether the processing of sensory inputs by the somatosensory thalamo-cortical network was modified

during the isoelectric state, we applied controlled air puffs to the rat contralateral whiskers and compared the sensory responses generated in the ECoG and S1BF pyramidal neurons between the different brain states.

We first examined the WERs in the S1BF ECoG ($n = 13$ rats), which provide an inclusive assessment of information processing in the somatosensory thalamo-cortical pathway. Average cortical responses exhibited, during the control state, the classically observed complex waveform (Mahon & Charpier, 2012; Chipaux *et al.* 2013; Altwegg-Boussac *et al.* 2017), consisting of an initial negative component followed by two to three voltage deflections of varying polarity and amplitude (Fig. 4Aa). The first component, which corresponds to the initial synaptic excitation of S1BF pyramidal neurons (Mahon & Charpier, 2012; Charpier *et al.* 2020; see also Fig. 5B), had a mean control latency of 19.0 ± 4.4 ms

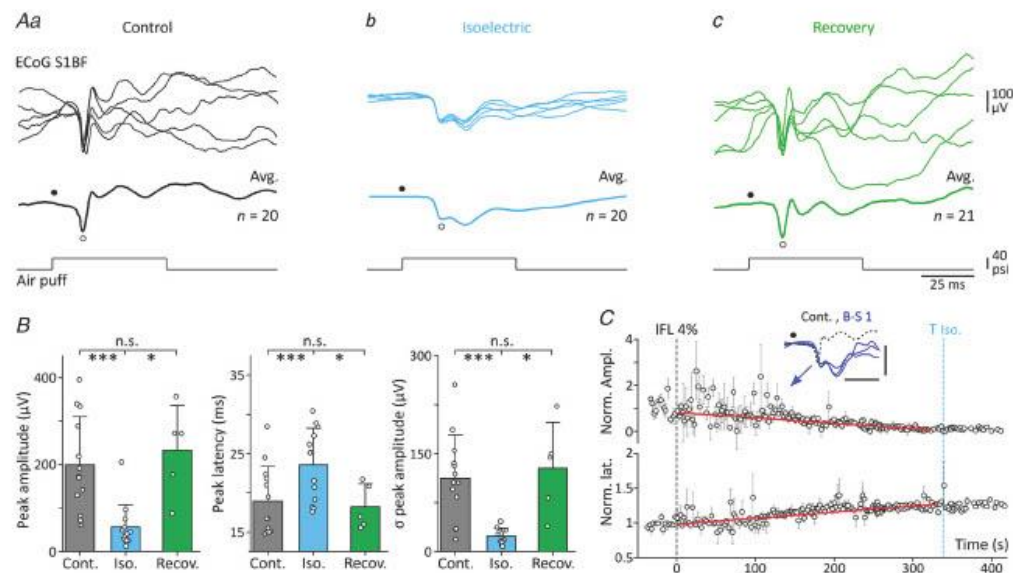


Figure 4. Whisker-evoked responses in the ECoG during control, isoelectric and recovery states
A, representative WERs (superimposition of five successive responses, top records) obtained in control (**Aa**), during the electro-cerebral inactivity (**Ab**) and after recovery of brain activity (**Ac**). The middle traces correspond to average responses (the number of trials are indicated) and the bottom traces represent the air-puff stimuli. The amplitude of the first downward response was measured as the potential difference between baseline (filled circles) and the peak of the deflection (open circles). The corresponding latency was calculated from the onset of the stimulus to the peak of the deflection. **B**, summary data of the WER amplitude, peak latency and trial-to-trial amplitude variability (σ amplitude). **C**, time-dependent changes in the amplitude (top) and latency (bottom) of WER first negative wave, from the induction onset (black dashed line, IFL 4%) to the establishment of a flat line ECoG (blue dashed line, T Iso.). Each data point represents average measurements from five experiments, after normalization to the corresponding mean control values. Error bars represent SEM. Red lines are linear regressions (amplitude, $r^2 = 0.50$, $P < 0.001$; latency, $r^2 = 0.63$, $P < 0.001$) applied from the onset of the induction to the beginning of the isoelectric state. The three superimposed dark blue traces are examples of WERs evoked during the B-S period (at the time indicated by the arrow), the dashed-line record corresponds to a control response (same experiment as in **A**). Calibration bars: 300 μ V, 25 ms. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; n.s., non-significant.

($n = 13$ rats), a peak amplitude of $200 \pm 109 \mu\text{V}$ ($n = 13$ rats) and a trial-to-trial amplitude variability of $113 \pm 65 \mu\text{V}$ (σ ampl., $n = 13$ rats) (Fig. 4Aa and B). Suppression of spontaneous activity caused a delay in the latency of the first peak (23.6 ± 4.6 ms, $n = 13$ rats; $P < 0.001$), concomitantly with a reduction in its amplitude ($56 \pm 50 \mu\text{V}$, $n = 13$ rats; $P < 0.001$) which became much more stable over successive stimulations (σ ampl. = $24 \pm 5 \mu\text{V}$, $n = 13$ rats; $P < 0.001$) (Fig. 4Ab and B). In the five experiments in which sensory-evoked potentials could be measured after restoration of brain activity, a near complete recovery of WER parameters was found (Lat. = 18.3 ± 2.9 ms, Ampl. = $233 \pm 102 \mu\text{V}$, σ ampl. = $128 \pm 70 \mu\text{V}$, $n = 5$ rats; $P > 0.3$ for each paired comparison) (Fig. 4Ac and B). In a subset of experiments, we investigated the time-dependent changes (relative to control values) in the latency and amplitude of the WER first negative component throughout the induction

process. The progressive decrease in WER amplitude, at a rate of $-14.0\% \text{ min}^{-1}$, was accompanied by a gradual increase in the latency ($+5.3\% \text{ min}^{-1}$) (Fig. 4C). In this subset of experiments, the amplitude and latency of WER after installation of the isoelectric state were decreased by $76 \pm 11\%$ and increased by $37.2 \pm 6.1\%$ compared to control values, respectively (Fig. 4C). Sensory responses evoked in the ECoG during the B-S epochs strikingly differed from the WER induced in control conditions, displaying a more complex waveform – with larger and wider components – rather resembling the spontaneously occurring burst events (Fig. 4C, inset).

The attenuation of whisker-evoked responses in the contralateral ECoG in the isoelectric condition could result from three non-exclusive mechanisms, including a weakening of the responsiveness of thalamo-cortical neurons, a reduction in the number of responsive cortical neurons and a decrease of synaptic responses in individual

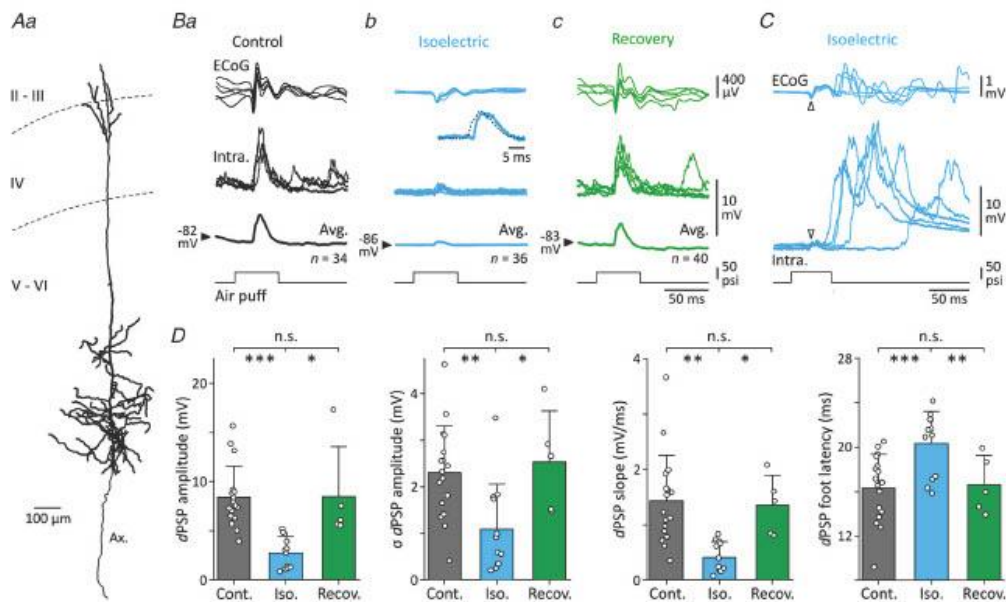


Figure 5. Whisker-evoked responses in 51BF neurons during control, isoelectric and recovery states

A, morphological features of a neurobiotin-filled layer 5 pyramidal neuron responding to whisker stimulations. Ax., axon. B, simultaneous ECoG (top traces) and intracellular responses of a pyramidal cortical neuron (upper middle traces, same neuron as in A) to five whisker stimuli (bottom traces), applied during control (Ba), isoelectric (Bb) and recovery (Bc) brain states. The lower middle traces are the corresponding average responses (the number of computed responses is indicated). The inset in Bb illustrates the magnified average responses obtained in control and during electro-cerebral inactivity after amplitude normalization. Traces were superimposed by matching the V_m at the foot of synaptic responses. C, superposition of atypical sensory-induced ECoG and intracellular responses ($n = 5$) that could be obtained in the same neuron during the isoelectric condition. Note the small initial responses (arrowheads) as in Bb followed by large-amplitude complex potentials. D, summary data of the dPSP amplitude, trial-to-trial amplitude variability (σ amplitude), dPSP rising slope and dPSP foot latency obtained in the three conditions. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., non-significant. A–C are from the same cell.

cortical cells. We explored these different hypotheses by analysing first the sensory responses in the intracellularly recorded S1BF pyramidal neurons (Fig. 5A) ($n = 17$ neurons). In control conditions, optimal whisker stimuli produced in all recorded cells depolarizing post-synaptic potentials (dPSPs) which were time-locked with the ECoG responses. On average, control dPSPs had a mean amplitude of 8.4 ± 3.1 mV, an initial rate of depolarization of 1.43 ± 0.81 mV ms⁻¹ and a foot latency ranging from 9.2 to 20.5 ms (16.3 ± 3.0 ms, $n = 17$ neurons) (Fig. 5Ba and D). A limited number of cortical cells ($n = 5$) could produce suprathreshold responses to sensory stimulations, with a firing probability ranging from 0.05 to 0.65. The trial-to-trial amplitude variability of subthreshold synaptic responses was elevated (σ dPSP ampl. = 2.3 ± 1.0 mV, $n = 17$ neurons), as previously found for whisker-evoked responses in S1BF neurons in the presence of a sustained synaptic noise (Altwegg-Boussac *et al.* 2017). Five out of the 17 (~29%) tested cortical neurons no longer displayed detectable sensory responses after the establishment of the isoelectric state, indicating a decrease in the number of sensory-responding neurons in the cortex. In the remaining neurons, clear-cut whisker-evoked synaptic depolarizations could be clearly identified, with, however, a marked attenuation of their amplitude (2.8 ± 1.6 mV, $n = 12$ neurons, $P < 0.001$) (Fig. 5Bb and D) compared to control responses. This reduction in dPSP amplitude was likely to be underestimated because of the expected augmentation in the driving force of synaptic currents caused by membrane hyperpolarization (Cont. $V_m = -73.5 \pm 6.1$ mV; Iso. $V_m = -78.6 \pm 5.1$ mV, $n = 12$ neurons; $P < 0.001$). Synaptic responses of responding cells also exhibited a reduction in their amplitude variability (σ dPSP ampl. = 1.1 ± 1.0 mV, $n = 12$ neurons; $P = 0.003$) (Fig. 5D), together with a slowing of their rising phase (0.41 ± 0.27 mV ms⁻¹, $n = 12$ neurons, $P < 0.001$) (Fig. 5D). The foot latency of whisker-evoked dPSPs was augmented (20.3 ± 2.9 ms, $n = 12$ neurons; $P < 0.001$) (Fig. 5D), with a time lag consistent with that found in the corresponding ECoG responses (see Fig. 4A and B). We checked that cortical neurons lacking sensory responses in the isoelectric state ($n = 5$) did not display distinctive electrical membrane properties, including the mean V_m (-76.3 ± 4.3 mV), R_m (29.2 ± 10.7 M Ω) and τ_m (6.0 ± 2.0 ms), compared to the responding cells ($P > 0.3$ for each parameter). In four responding cortical neurons, sensory stimulations applied during the isoelectric condition could evoke, in ~17% of the trials ($n = 4$ neurons), complex responses characterized by a small initial depolarization, resembling in shape and latency the isolated dPSPs (Fig. 5Bb vs. Bc, arrowhead), followed by large amplitude (~15–30 mV, $n = 4$ neurons) bursts of synaptic-like depolarizations which could last up to 200 ms (Fig. 5C, bottom). This

was mirrored in the ECoG by analogous complex waveforms of large amplitude (Fig. 5C, top), suggesting that the sensory-evoked synaptic bursts were synchronized among cortical cells.

Again, restoration of spontaneous brain activity by lowering the rate of isoflurane led to the recovery of pre-induction values of neuronal sensory responses parameters ($n = 5$ tested neurons), including their amplitude (8.5 ± 5.0 mV, $P = 0.8$), time-to-time variability (σ dPSP ampl. = 2.5 ± 1.1 mV, $P = 0.5$), foot latency (16.6 ± 2.5 ms, $P = 0.3$) and depolarizing slope (1.35 ± 0.54 mV ms⁻¹, $P = 0.65$) (Fig. 5Bc and D). As expected, the regaining of neuronal responses paralleled the restoration of WER properties (Fig. 5Bc).

These results indicate that S1BF pyramidal neurons can still process sensory inputs during the isoelectric brain state. However, the integration of information is largely altered by a reduction in the number of responsive neurons, an obliteration of their capacity to be activated by whisker-related inputs, a delayed latency and a reduced amplitude of subthreshold sensory responses, together with an increase in their time-to-time reliability.

Silencing of thalamo-cortical neurons and dampening of thalamic responsiveness during the isoelectric state

A reduction in thalamo-cortical excitability and firing during brain silencing could also contribute to the lowering of spontaneous activity and sensory-induced responses found at cortical level. We thus examined the on-going firing and sensory responsiveness in somatosensory thalamo-cortical neurons during isoelectric states. Single ($n = 14$) or double ($n = 4$) extracellular recordings were obtained from thalamic neurons ($n = 22$) located in the VPM or at the border between VPM and the posterior medial nucleus (POm) (Fig. 6A), simultaneously with an ECoG of the related S1BF (Fig. 6C). Results obtained from the whole set of thalamo-cortical cells were combined since no specific relationship between the location of neurons and their firing behaviour was found. The five cells loaded with neurobiotin using the juxta-cellular injection method revealed the classical morphology of thalamo-cortical relay neurons (Steriade *et al.* 1997; Polack *et al.* 2009), including a fusiform perikaryon with a diameter of 14–27 μ m and 7–9 primary dendrites that profusely ramified (Fig. 6B).

Thalamic cells displayed in control condition a sustained (mean firing rate = 2.66 ± 2.2 Hz, from 0.4–9 Hz, $n = 22$ neurons) and irregular (CV2 ISIs range: 0.6–1.6, $n = 22$ neurons) spontaneous firing, which was replaced by single APs or doublets interspersed with silences during the initial B-S period (B-S1) following induction onset (Fig. 6C–E). Like neocortical neurons, once the isoflurane-induced electro-cerebral

inactivity was achieved in the ECoG, the spontaneous firing of all recorded thalamic cells ceased (Fig. 6C and D, Isoelectric). The firing pattern during the B-S period subsequent to the restoration of control level of isoflurane strongly resembled that recorded during B-S1 (Fig. 6C and D, B-S2). The regaining of background activity in the S1BF ECoG was followed by the return of a

continuous spontaneous discharge in thalamic cells (after 1.16 ± 1.58 min, $n = 14$ neurons recorded throughout the complete process), with, however, a slightly reduced mean firing rate compared to control periods (2.0 ± 1.8 Hz, $n = 14$ neurons; $P = 0.047$) but a retrieved degree of irregularity (Recov. CV2 ISIs = 0.94 ± 0.20 , $n = 14$ neurons; $P = 0.2$) (Fig. 6C–E).

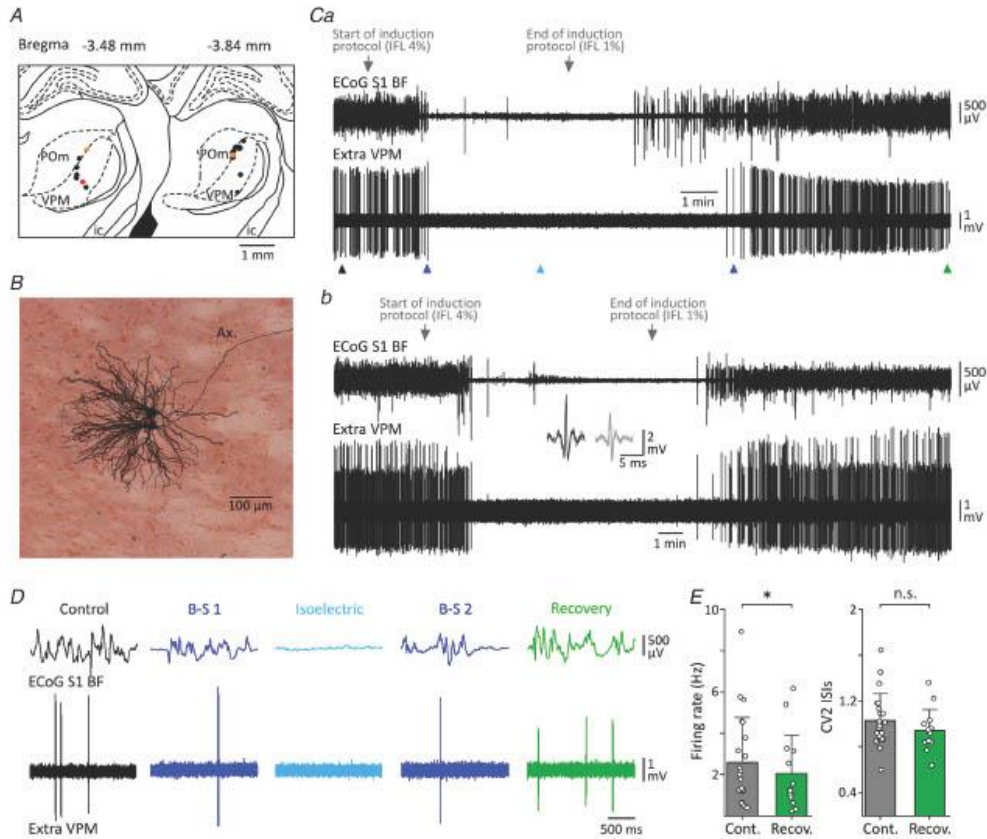


Figure 6. Changes in thalamo-cortical neurons firing from the induction of the isoelectric state to the recovery of brain activity

A, slice drawings of a rat brain (modified from Paxinos & Watson, 1986) at the indicated stereotaxic coordinates. The black circles indicate the position of thalamic neurons recorded extracellularly from the VPM nucleus or at the border of VPM and POM nuclei. The red circle indicates the position of the pair of labelled neurons in B and the orange circles locate the recordings shown in C. Ax., axon. C, simultaneous recordings of S1BF ECoG (top traces) and a single- (Ca, bottom trace) or a double- (bottom trace, Cb) VPM unit during a standard protocol of suppression and recovery of ECoG activities. Note that the delay between the recovery of ECoG activity after restoration of a control level of isoflurane and the resumption of thalamic firing in Ca was uncommonly long in this experiment (see text for details). The insets in Cb are the superpositions of five individual APs isolated from the two simultaneously recorded units. D, expanded portions (2 s) of ECoG and thalamic records shown in Ca at the periods indicated by the colour-coded arrowheads. E, summary data of mean spontaneous firing rate and regularity of discharge (CV2 ISIs) of VPM units in control and recovery periods. * $P < 0.05$; n.s., non-significant.

Nine spontaneously active VPM neurons (3.1 ± 1.7 Hz, $n = 9$ neurons) were challenged with whisker stimulations ($n = 10\text{--}100$, 50 psi, 0.5 Hz) before and during the isoelectric state (Fig. 7A and B). In control conditions, the firing probability of thalamo-cortical cells in response to sensory stimuli was 0.49 ± 0.37 ($n = 9$ neurons). The corresponding mean number of sensory-evoked APs per stimulation was 1.30 ± 0.40 ($n = 9$ neurons) and the latency of the first evoked AP, relative to air-puff onset, was 17.1 ± 4.7 ms ($n = 9$ neurons), a value similar to that previously reported for the same cell population (Brecht & Sakmann, 2002; Williams *et al.* 2020) and compatible with the latency of cortical neurons dPSPs (13–20 ms). Sensory responsiveness of thalamo-cortical neurons was found to be largely reduced during the electro-cerebral inactivity. In 5 out of the 9 stimulated thalamic neurons, we observed a complete abolition of thalamic firing responses after suppression of brain activity (Fig. 7Aa and Ab). In the remaining neurons, whisker stimuli could still trigger APs in the isoelectric condition, with however a lower probability (Cont. firing probability = 0.64 ± 0.38 ; Iso. firing probability = 0.13 ± 0.07 , $n = 4$ neurons; $P = 0.008$) (Fig. 7Ba and Bb). In this later set of thalamic cells, firing latency was delayed compared to control values (Cont. Lat. = 15.4 ± 0.6 ms; Iso. Lat. = 18.9 ± 2.3 ms, $n = 4$ neurons; $P < 0.05$) but the average number of APs per sensory stimulus was kept unchanged (Cont. APs/stim. = 1.3 ± 0.4 ; Iso. APs/stim. = 1.0 ± 0.1 , $n = 4$ neurons; $P = 0.2$) (Fig. 7C). This difference in sensory responsiveness among thalamic neurons could not be attributed to a specific location within the VPM. When responding and non-responding thalamic neurons were pooled together, the collapse of firing probability was even more evident, going from 0.49 ± 0.37 ($n = 9$ neurons) in control to 0.06 ± 0.08 ($n = 9$ neurons; $P = 0.008$) during electro-cerebral inactivity (Fig. 7C). Extracellular recordings of VPM neurons were unfortunately not continued for a sufficiently long period of time after resumption of spontaneous activity to test for a possible recovery of thalamic sensory responsiveness.

These results demonstrate that thalamic neurons were globally less responsive during the isoelectric state, even if a portion of them could still be activated by whisker stimulations. This suggests that an altered thalamo-cortical input may participate in the reduced sensory processing observed at the cortical level.

Discussion

In order to examine the neuronal functions that collapse or persist during an isoelectric brain state, we developed a new *in vivo* rat model in which an electro-cerebral state of inactivity was consistently induced and reversed through the controlled adjustment of the isoflurane concentration. In the isoelectric condition, deep-layer S1BF neurons

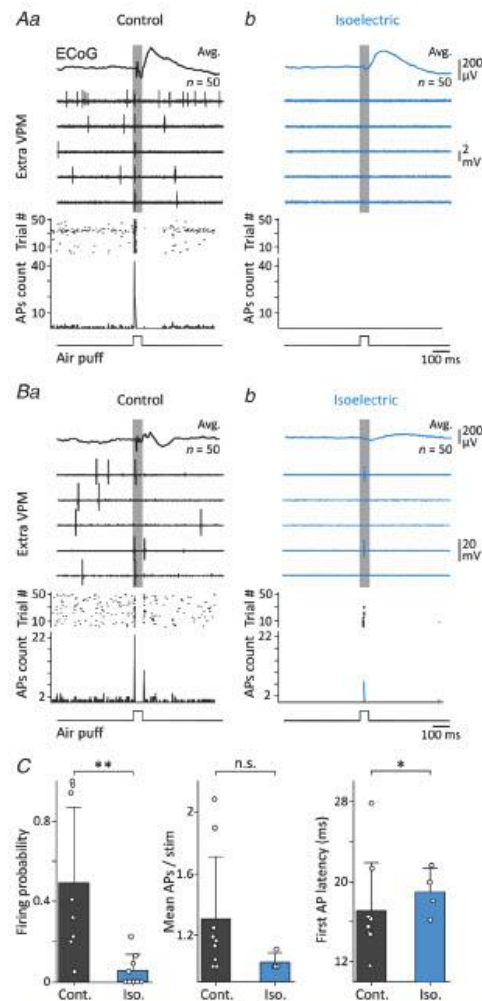


Figure 7. Changes in the sensory responsiveness of thalamo-cortical neurons during the isoelectric brain state
A, example of a thalamic neuron that became unresponsive to sensory stimuli. Five successive responses of an extracellularly recorded VPM neuron to whisker stimulations (Air puff), obtained in control (Aa) and after establishment of the isoelectric state (Ab). The average ($n = 50$ trials) ECoG response is shown above the cell records. The corresponding raster plots of cell discharge ($n = 50$ trials) and peri-stimulus histograms of APs counts, centred with respect to the onset of sensory stimulus, are depicted below. **B**, example of a thalamic neuron with residual sensory responses. Same representation as in **A**. **C**, summary data, including all recorded thalamic neurons, of average firing probability in response to sensory stimuli, number of APs evoked per stimulation and first AP latency. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; n.s., non-significant.

displayed a sustained membrane hyperpolarization and a lack of change in their input resistance. Their intrinsic excitability was decreased, but all intracellularly recorded neurons conserved their endogenous ability to be activated by input currents of high intensity. Cortical whisker-evoked sensory responses were increased in latency and decreased in amplitude, partly due to a substantial lowering of sensory-induced firing in the somatotopically aligned thalamic neurons. These results, showing that sensory neurons and networks conserve a certain level of excitability and the ability to integrate external inputs during an isoflurane-related comatose state, confirm and extend our previous findings obtained from another rat model of isoelectric brain state using high doses of barbiturate (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2016, 2017). The persistence of reduced cortical functions during brain silencing can thus be generalized to different forms of pharmacology-induced isoelectric comas, further challenging the classical clinical and neurophysiological appreciation of such deep comatose states generally considered as non-functional and unresponsive.

Isoflurane-induced brain silencing: from neurons to ECoG

High doses of isoflurane ($\geq 3.5\%$) were used here to interrupt neuronal activities in the thalamo-cortical network and establish a continuous flat-line ECoG. Such a cortical silencing after administration of comparable doses of isoflurane has been described in humans (2.5%; Eger *et al.* 1971), cats ($> 3\%$; Kroeger & Amzica, 2007; Kroeger *et al.* 2013) and dogs ($> 3\%$; Newberg *et al.* 1983). As previously reported in cats (Kroeger & Amzica, 2007), the induction of an inactive ECoG in our rodent model correlated with a complete suppression of synaptic and firing events, demonstrating a collapse of on-going activity in cortical networks.

Although the cellular and synaptic targets of general anaesthetics have been extensively studied (Franks & Lieb, 1994; Alkire *et al.* 2000; Nelson *et al.* 2002; Campagna *et al.* 2003), the neuronal mechanisms by which they convert an active cortical pattern into an isoelectric state are still not well characterized. An inhibitory, dose- and time-dependent, effect of isoflurane on spontaneous excitatory postsynaptic events has been previously described in neocortical slices from rodents and humans (El-Beheiry & Puil, 1989a; Berg-Johnsen & Langmoen, 1990), as well as in rodent hippocampal and brainstem *in vitro* preparations (MacIver *et al.* 1996; Ouanounou *et al.* 1998; Wu *et al.* 2004). This dampening of excitatory postsynaptic potentials, accompanied in cortical neurons by a cessation of spontaneous firing (El-Beheiry & Puil, 1989a; Antkowiak & Hlefrich-Föster,

1998), was not due to a shunting effect produced by an increased GABAergic activity, as it could persist after blockade of GABA type-A receptors (El-Beheiry & Puil, 1989a; MacIver *et al.* 1996; Ouanounou *et al.* 1998; but see Antkowiak & Hlefrich-Föster 1998). It may rather result from multiple inhibitory presynaptic mechanisms at glutamatergic connections. Indeed, isoflurane at clinically relevant doses has been shown to decrease synaptic vesicle exocytosis in glutamatergic neurons by reducing presynaptic AP amplitude and, thus, calcium entry into axon terminals (Wu *et al.* 2004; Baumgart *et al.* 2015). This alteration in synaptic release could act in synergy with an increased uptake of glutamate into presynaptic terminals (Larsen *et al.* 1997) and a reduction in the opening time of NMDA channels (Yang & Zorumski, 1991). Finally, the negative effects of isoflurane on excitatory synapses could co-exist with a positive effect on inhibitory connections, where it has been shown to enhance or prolong GABA type-A currents (Harrison *et al.* 1993; Mihic *et al.* 1997; Dai *et al.* 2012).

It is thus likely that these various effects of isoflurane on synaptic transmission contribute to the suppression of on-going activity in cortical neurons. This interruption of the background synaptic drive resulted in a flat V_m and a sustained membrane hyperpolarization by about 6 mV, a value similar to that found *in vivo* in the barbiturate-induced isoelectric condition (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2017). Polarization of cortical neurons was, however, less pronounced than that produced by isoflurane in cats (~ -10 mV) (Kroeger & Amzica, 2007), suggesting that the level of hyperpolarization was dependent on species rather than drug. Cell polarization could be a direct consequence of the decrease in synaptic drive, instigating a passive shift of V_m towards its resting value (Altwegg-Boussac *et al.* 2014). This could be amplified by the positive effect of isoflurane on the voltage-independent two-pore-domain background potassium channels, responsible for a powerful non-inactivating outward potassium current (Patel *et al.* 1999).

The suspension of cortical activity was concomitant with a collapse of firing in thalamo-cortical neurons, as demonstrated with extracellular microelectrodes. While we did not investigate the intracellular properties of thalamic cells in this study, we can presume a decrease in both synaptic drive and membrane excitability, as observed in our barbiturate rodent model (Altwegg-Boussac *et al.* 2017). Previous *in vitro* studies examining the effects of high doses of isoflurane (2%) on the electrical membrane properties of rat thalamic neurons *in vitro* reported a membrane hyperpolarization (Ries & Puil, 1999; Timic Stamenic *et al.* 2019), a reduction of both tonic and bursting firing (Ries & Puil, 1999; Timic Stamenic *et al.* 2019), a dose-dependent increase in membrane conductance (Ries & Puil, 1999) and an

inhibitory action on calcium channels (Timic Stamenic *et al.* 2019). All these cell alterations could concurrently participate to dampen the activity of thalamo-cortical neurons. Finally, the concomitant interruption of firing in cortical and thalamic cells probably leads to the cessation of on-going activity in thalamo-cortical synaptic networks, causing the silencing of the ECoG.

Partial alteration of cellular and sensory responsiveness

As previously reported in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2017), we found that R_m and τ_m values of S1BF neurons remained unchanged after suppression of spontaneous activity. This challenges the classical assumption that an intense synaptic drive increases the total membrane conductance and therefore reduces both neuronal parameters as measured from the soma (Paré *et al.* 1998; Destexhe *et al.* 2003; Polack *et al.* 2009). An activation, caused by V_m hyperpolarization, of an inward rectifying voltage-gated conductance counterbalancing the change in synaptic conductance (Waters & Helmchen, 2006) can be excluded since no anomalous rectification was attested in the recorded cortical neurons. Instead, it is plausible that the activation of the two-pore-domain background potassium channels by isoflurane (Patel *et al.* 1999; see above) may result in a compensating increase in membrane conductance.

Cortical neurons challenged by direct stimulations of varying intensity during the isoflurane-induced isoelectric state displayed a rightward shift in their $F-I$ relations, resulting in an increased firing threshold. An analogous decrease in membrane excitability was observed in cortical, hippocampal and thalamic neurons *in vivo* during a barbiturate-induced isoelectric brain state (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2016, 2017), as well as in cortical neurons and motoneurons experiencing elevated doses of isoflurane *in vitro* (Berg-Johnsen & Langmoen, 1987, 1990; El-Beheiry & Puil, 1989b; Sirois *et al.* 1998). This reduced cell excitability could result from the V_m hyperpolarization (Shu *et al.* 2003; Altwegg-Boussac *et al.* 2014) and/or from the inhibitory action of isoflurane on sub-threshold sodium currents (Sirois *et al.* 1998; Zhao *et al.* 2019). Augmented values of threshold current were accompanied by a robust enhancement (by ~45%) of the neuronal gain, contrasting with the attenuation or stability of $F-I$ curve slopes in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2014). Although the membrane mechanisms responsible for the change in neuronal gain remain so far obscure, we can speculate that the isoflurane-related reduction in calcium-dependent after-hyperpolarization potentials (Berg-Johnsen & Langmoen, 1990) could

facilitate repetitive firing in cortical neurons submitted to increasing levels of excitation.

The silencing of spontaneous brain activities also resulted in a decrease of sensory responses in cortical neurons. This result differs from the amplification of sensory-evoked cortical responses reported in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2017). This difference between the two models is, however, consistent with the stronger inhibition of sensory responses in cat primary auditory cortex neurons by isoflurane, as compared to barbiturate (Cheung *et al.* 2001). In the present study, the amplitude of dPSPs induced by whisker deflections in S1BF pyramidal neurons was reduced by about 63% compared to control values. The V_m of cortical cells during the isoflurane-induced isoelectric state was close to or more hyperpolarized than the reversal potential of chloride, suggesting that depolarizing synaptic responses were caused by a mixture of glutamatergic and GABAergic currents (Wilent & Contreras, 2004; Altwegg-Boussac *et al.* 2017). It is likely that both types of synaptic components were depressed in the isoelectric condition, either through a direct pre-synaptic effect of isoflurane at glutamatergic connections (Wu *et al.* 2004; Baumgart *et al.* 2015; see above for detailed explanation) or indirectly via the blockade of the glutamate receptors on inhibitory interneurons (Perouansky *et al.* 1996). It is worth noting that the decreased amplitude of synaptic responses was probably underestimated since the V_m hyperpolarization during the electro-cerebral silence is expected to increase the driving force of synaptic currents in absence of concomitant changes in membrane conductance.

The attenuation of cortical responsiveness was partly due to a dampening of thalamic sensory responses to whisker inputs. The decrease in sensory-evoked firing in thalamo-cortical neurons could result, as observed in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2017), from a hyperpolarization of VPM cells in the isoelectric condition which would prevent dPSPs from reaching voltage firing threshold. We cannot exclude an isoflurane-mediated alteration of the membrane excitability of thalamo-cortical cells, combining a defect in the generation of both tonic and bursting firing (Ries & Puil, 1999; Timic Stamenic *et al.* 2019) and a decrease in R_m (Ries & Puil, 1999). Consistent with this possibility, a negative dose-dependent effect of isoflurane on sensory-evoked thalamic firing in response to mechanical stimulation of the body surface has been reported, while evoked-firing in the trigemino-thalamic fibres appeared much less affected (Detsch *et al.* 1999). Moreover, isoflurane at high doses has been shown to reduce the amplitude of pre-volley in the hippocampus *in vitro*, together with a slowing in AP conduction velocity (Berg-Johnsen & Langmoen, 1986). A similar process in the thalamo-cortical pathway could participate in both

the reduced amplitude and increased latency of cortical responses in isoelectric conditions.

As in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2016, 2017), we found that physiological parameters, including oxygen saturation of arterial blood and core temperature, remained stable during the period of cerebral silence. This indicates that metabolic changes, which are unlikely at the isoflurane concentrations used here (Newberg *et al.* 1983), do not play a major role in the neuronal and network alterations reported here.

Functional considerations

The present study confirms our previous claim (Altwegg-Boussac *et al.* 2017) that an electrically silent brain, associated with a deep comatose state (Eger *et al.* 1971; Young, 2000; MacIver & Bland, 2014; Altwegg-Boussac *et al.* 2017), is not an inhibited and unresponsive brain whose neurons and networks are no longer functional. It rather provides a latent, potentially responding, brain with hyperpolarized neurons still capable of being excited by direct and external stimuli despite a reduced level of responsiveness. As demonstrated in the barbiturate model (Altwegg-Boussac *et al.* 2017) and in the present study, cortical excitability could be fully restored when neurons in the isoelectric condition were depolarized to control V_m values. Because resting integrative properties of cortical, hippocampal and thalamic neurons remained stable in the barbiturate (Altwegg-Boussac *et al.* 2017) and isoflurane rat models, we can assume that the main functional defect operating at the single neuron level is neuronal polarization, which thus provides the leading cause of the reduced cell responsiveness. Although sensory responses were attenuated after suppression of background synaptic activity, they appeared to be more stereotyped in terms of amplitude and latency during repetitive stimulations. This is consistent with the common assumption that an intense on-going synaptic activity is mainly responsible for the irregular spontaneous and evoked firing of pyramidal neurons *in vivo* (Burns, 1968; McCormick *et al.* 2003; Altwegg-Boussac *et al.* 2014, 2017).

Based on the formalism of information theory (Shannon, 1948) used to assess the significance of neuronal spike timing as sequences of '0s' and '1s' (Reinagel, 2000), denoting the absence or the presence of an AP, the information content of the isoelectric state is null during the baseline period as the brain is deprived of any 'bits' of information. However, the increased reliability of synaptic responses over successive stimulations, along with the augmented temporal precision of sensory-evoked firing (Altwegg-Boussac *et al.* 2017; present study) indicates an enhancement of stimulus-response association in the isoelectric condition. Thus, the *information transfer* between external stimuli and cortical neurons is no more

corrupted by the synaptic noise, which provides the main source of response uncertainty. This strengthening of the deterministic relation between the stimulus and the cell response would render 'noiseless' neurons better predictors of external stimuli. Yet, because of the low firing probability in response to sensory inputs, the stimulus-response *mutual information* (Reinagel, 2000) remains low. The isoelectric brain would therefore act as a paradoxical 'receiver' of external information, with highly reliable and stereotyped neuronal responses but a weak *information transfer* system when considering the digital model of information.

Because an isoelectric brain state is always associated with a lack of consciousness in all its dimensions, our findings challenge the assumption that a reliable neuronal response is a critical aspect of the mechanisms of consciousness and that temporally dispersed sensory responses fail to reach awareness (Reber *et al.* 2017). Rather, they suggest that a conscious sensory experience requires the cooperation of firing responses in appropriate cortical regions (Reber *et al.* 2017) with an endogenous, information-rich, background activity (Destexhe, 2011) in neural networks.

References

- Aasebø IEJ, Lepperød ME, Stavrinou M, Nøkkevengen S, Einevoll G, Hafting T & Fyhn M (2017). Temporal processing in the visual cortex of the awake and anesthetized rat. *eNeuro* 4, ENEURO.0059-17.
- Aksenov DP, Miller MJ, Dixon CJ & Wyrwicz AM (2019). The effect of sevoflurane and isoflurane anesthesia on single unit and local field potentials. *Exp Brain Res* 237, 1521–1529.
- Alkire MT, Haier RJ & Fallon JH (2000). Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness. *Conscious Cogn* 9, 370–386.
- Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S & Charpier S (2014). Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity *in vivo*. *J Physiol* 592, 3577–3595.
- Altwegg-Boussac T, Mahon S, Chavez M, Charpier S & Schramm AE (2016). Induction of an isoelectric brain state to investigate the impact of endogenous synaptic activity on neuronal excitability *in vivo*. *J Vis Exp* 109: e53576.
- Altwegg-Boussac T, Schramm AE, Ballesterio J, Grosselin F, Chavez M, Lecas S, Baulac M, Naccache L, Demeret S, Navarro V, Mahon S & Charpier S (2017). Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain* 140, 2381–2398.
- Antkowiak B & Helfrich-Förster C (1998). Effects of small concentrations of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons *in vitro*. *Anesthesiology* 88, 1592–1605.

- Baumgart JP, Zhou ZY, Hara M, Cook DC, Hoppa MB, Ryan TA & Hemmings HC Jr (2015). Isoflurane inhibits synaptic vesicle exocytosis through reduced Ca²⁺ influx, not Ca²⁺-exocytosis coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 11959–11964.
- Berg-Johnsen J & Langmoen IA (1986). The effect of isoflurane on unmyelinated and myelinated fibres in the rat brain. *Acta Physiol Scand* **127**, 87–93.
- Berg-Johnsen J & Langmoen IA (1987). Isoflurane hyperpolarizes neurones in rat and human cerebral cortex. *Acta Physiol Scand* **130**, 679–685.
- Berg-Johnsen J & Langmoen IA (1990). Mechanisms concerned in the direct effect of isoflurane on rat hippocampal and human neocortical neurons. *Brain Res* **507**, 28–34.
- Bird TD & Plum F (1968). Recovery from barbiturate overdose coma with a prolonged isoelectric electroencephalogram. *Neurology* **18**, 456–60.
- Brecht ML & Sakmann B (2002). Whisker maps of neuronal subclasses of the rat ventral posterior medial thalamus, identified by whole-cell voltage recording and morphological reconstruction. *J Physiol*, **538**, 495–515.
- Bullock TH (2003). Have brain dynamics evolved? Should we look for unique dynamics in the sapient species? *Neural Comput* **15**, 2013–2027.
- Burns BD (1968). *The Uncertain Nervous System*. Edward Arnold, London.
- Buzsáki G, Anastassiou CA & Koch C (2012). The origin of extracellular fields and currents – EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* **13**, 407–420.
- Buzsáki G, Logothetis N & Singer W (2013). Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron* **80**, 751–764.
- Campagna JA, Keith W, Miller KW & Forman SA (2003). Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* **348**, 2110–2124.
- Caton R (1875). The electric currents of the brain. *Br Med J* **2**, 278.
- Charpier S, Pidoux M & Mahon S (2020). Converging sensory and motor cortical inputs onto the same striatal neurons: An in vivo intracellular investigation. *PLoS One* **15**, e0228260.
- Chatrian GE, Bergamasco B, Bricolo A, Frost JD & Prior PF (1996). IFCN recommended Standards for electro-physiologic monitoring in comatose and other unresponsive states. report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **99**, 103–122.
- Cheung SW, Nagarajan SS, Bedenbaugh PH, Schreiner CE, Wang X & Wong A (2001). Auditory cortical neuron response differences under isoflurane versus pentobarbital anesthesia. *Hear Res* **156**, 115–127.
- Chipaux M, Vercueil L, Kaminska A, Mahon S & Charpier S (2013). Persistence of cortical sensory processing during absence seizures in human and an animal model: evidence from EEG and intracellular recordings. *PLoS One* **8**, e58180.
- Chung S, Li X & Nelson SB (2002). Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* **34**, 437–446.
- Claassen J, Hirsch LJ, Emerson RG & Mayer SA (2002). Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam: a systematic review. *Epilepsia* **43**, 146–153.
- Dai S, Perouansky M & Pearce RA (2012). Isoflurane enhances both fast and slow synaptic inhibition in the hippocampus at amnesic concentrations. *Anesthesiology* **116**, 816–823.
- Destexhe A (2011). Intracellular and computational evidence for a dominant role of internal network activity in cortical computations. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 717–725.
- Destexhe A, Rudolph M & Paré D (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat Rev Neurosci* **4**, 739–751.
- Detsch O, Vahle-Hinz C, Kochs E, Siemers M & Bromm B (1999). Isoflurane induces dose-dependent changes of thalamic somatosensory information transfer. *Brain Res* **829**, 77–89.
- Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.
- Eger EI 2nd, Stevens WC & Cromwell TH (1971). The electroencephalogram in man anesthetized with forane. *Anesthesiology* **35**, 504–508.
- El-Beheiry H & Poul E (1989a). Anaesthetic depression of excitatory synaptic transmission in neocortex. *Exp Brain Res* **77**, 87–93.
- El-Beheiry H & Poul E (1989b). Postsynaptic depression induced by isoflurane and Althesin in neocortical neurons. *Exp Brain Res* **75**, 361–368.
- Ferron JF, Kroeger D, Chever O & Amzica F (2009). Cortical inhibition during burst suppression induced with isoflurane anesthesia. *J Neurosci* **29**, 9850–9860.
- Franks NP & Lieb WR (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, 607–614.
- Ganes T & Lundar T (1983). The effect of thiopentone on somatosensory evoked responses and EEGs in comatose patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **46**, 509–514.
- Geocadin RG, Sherman DL, Hansen HC, Kimura T, Niedermeyer E, Thakor NV & Hanley DF (2002). Neurological recovery by EEG bursting after resuscitation from cardiac arrest in rats. *Resuscitation* **55**, 193–200.
- Harrison NL, Kugler JL, Jones MV, Greenblatt EP & Pritchett DB (1993). Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol* **44**, 628–632.
- Henze DA & Buzsáki G (2001). Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity. *Neuroscience* **105**, 121–130.
- Hofmeijer J & van Putten MJAM (2016). EEG in postanoxic coma: Prognostic and diagnostic value. *Clin Neurophysiol* **127**, 2047–2055.
- Holt GR, Softky WR, Koch C & Douglas RJ (1996). Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons. *J Neurophysiol* **75**, 1806–1814.
- Husain AM (2006). Electroencephalographic assessment of coma. *J Clin Neurophysiol* **23**, 208–220.

- Jack JJB, Noble D & Tsien RW (1975). *Electric Current Flow in Excitable Cells*. Clarendon Press, Oxford.
- Johnson EL & Kaplan PW (2019). Clinical neurophysiology of altered states of consciousness: Encephalopathy and coma. In *Handbook of Clinical Neurology, Vol. 161 (3rd series) Clinical Neurophysiology: Diseases and Disorders*, eds Levin KH & Chauvel P, pp. 73–88. Elsevier, B.V.
- Kirshbaum R & Carollo V (1970). Reversible Iso-electric EEG in barbiturate coma. *JAMA* 212, 1215.
- Kroeger D & Amzica F (2007). Hypersensitivity of the anesthesia-induced comatose brain. *J Neurosci* 27, 10597–10607.
- Kroeger D, Florea B & Amzica F (2013). Human brain activity patterns beyond the isoelectric line of extreme deep coma. *PLoS One* 8, e75257.
- Larsen M, Hegstad E, Berg-Johnsen J & Langmoen IA (1997). Isoflurane increases the uptake of glutamate in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Br J Anaesth* 78, 55–59.
- Laureys S (2005). Death, unconsciousness and the brain. *Nat Rev Neurosci* 6, 899–909.
- Lopes da Silva F (1991). Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 79, 81–93.
- MacIver MB & Bland BH (2014). Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. *Front Syst Neurosci* 8, 203.
- MacIver MB, Mikulec AA, Amagasa SM & Monroe FA (1996). Volatile anesthetics depress glutamate transmission via pre-synaptic actions. *Anesthesiology* 85, 823–834.
- Mahon S & Charpier S (2012). Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J Neurosci* 32, 11377–11389.
- Manns ID, Sakmann B & Brecht M (2004). Sub- and supra-threshold receptive field properties of pyramidal neurones in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol* 556, 601–622.
- McCormick DA, Shu Y, Hasenstaub A, Sanchez-Vives M, Badoual M & Bal T (2003). Persistent cortical activity: mechanisms of generation and effects on neuronal excitability. *Cereb Cortex* 13, 1219–1231.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA & Harrison NL (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* 389, 385–389.
- Nelson LE, Guo TZ, Lu J, Saper CB, Franks NP & Maze M (2002). The sedative component of anesthesia is mediated by GABA_A receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci* 5, 979–984.
- Neske GT (2016). The slow oscillation in cortical and thalamic networks: mechanisms and functions. *Front Neural Circuits* 9, 88.
- Newberg LA, Milde JH & Michenfelder JD (1983). The cerebral metabolic effects of isoflurane at and above concentrations that suppress cortical electrical activity. *Anesthesiology* 59, 23–28.
- Orlowski JP, Erenberg G, Lueders H & Cruse RP (1984). Hypothermia and barbiturate coma for refractory status epilepticus. *Crit Care Med* 12, 367–372.
- Ouanounou A, Carlen PL & El-Beheiry H (1998). Enhanced isoflurane suppression of excitatory synaptic transmission in the aged rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 124, 1075–1082.
- Pape HC (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 299–327.
- Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G & Lazdunski M (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* 2, 422–426.
- Paré D, Shink E, Gaudreau H, Destexhe A & Lang EJ (1998). Impact of spontaneous synaptic activity on the resting properties of cat neocortical neurons in vivo. *J Neurophysiol* 79, 1450–1460.
- Paxinos G & Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Perouansky M, Kirson ED & Yaari Y (1996). Halothane blocks synaptic excitation of inhibitory interneurons. *Anesthesiology* 85, 1431–1438.
- Pidou M, Mahon S, Deniau JM & Charpier S (2011). Integration and propagation of somatosensory responses in the corticostriatal pathway: an intracellular study in vivo. *J Physiol* 589, 263–281.
- Pocock G & Richards CD (1993). Excitatory and inhibitory synaptic mechanisms in anaesthesia. *Br J Anaesth* 71, 134–147.
- Polack PO, Mahon S, Chavez M & Charpier S (2009). Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 19, 2078–2091.
- Poulet JFA & Crochet S (2019). The cortical states of wakefulness. *Front Syst Neurosci* 12, 64.
- Purdon PL, Sampson A, Pavone KJ & Brown EN (2015). Clinical electroencephalography for anesthesiologists: part I: background and basic signatures. *Anesthesiology* 123, 937–960.
- Reber TP, Faber J, Niediek J, Boström J, Elger CE & Mormann F (2017). Single-neuron correlates of conscious perception in the human medial temporal lobe. *Curr Biol* 27, 2991–2998.e2.
- Reinagel P (2000). Information theory in the brain. *Curr Biol* 10, R542–R544.
- Ries CR & Pull E (1999). Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons. *J Neurophysiol* 81, 1795–1801.
- Schramm AE, Carton-Leclercq A, Diallo S, Navarro V, Chavez M, Mahon S & Charpier S (2020). Identifying neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia. *Prog Neurobiol* 185, 101733.
- Shannon CE (1948). The mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* 27, 379–423.
- Shu Y, Hasenstaub A, Badoual M, Bal T & McCormick DA (2003). Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *J Neurosci* 23, 10388–10401.

- Silverman MG & Scirica BM (2016). Cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Trends Cardiovasc Med* **26**, 337–344.
- Sirois JE, Pancrazio JJ, Lynch C 3rd & Bayliss DA (1998). Multiple ionic mechanisms mediate inhibition of rat motoneurons by inhalation anaesthetics. *J Physiol* **512**, 851–862.
- Stecker MM, Cheung AT, Pochettino A, Kent GP, Patterson T, Weiss SJ & Bavaria JE (2001). Deep hypothermic circulatory arrest: I. Effects of cooling on electroencephalogram and evoked potentials. *Ann Thorac Surg* **71**, 14–21.
- Steriade M, Jones EG & McCormick DA (1997). *Thalamus: Organisation and Function*. Elsevier Science, Oxford.
- Steriade M (2000). Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* **101**, 243–276.
- Steriade M (2004). Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neuroscience* **5**, 121–134.
- Teich MC (1992). Fractal neuronal firing patterns. In *Single Neuron Computation*, eds McKenna T, Davis J & Zornetzer SF, pp. 589–625. Elsevier, Boston.
- Timic Stamenic T, Feseha S, Valdez R, Zhao W, Klawitter J & Todorovic SM (2019). Alterations in oscillatory behavior of central medial thalamic neurons demonstrate a key role of CaV3.1 isoform of T-channels during isoflurane-induced anesthesia. *Cereb Cortex* **29**, 4679–4696.
- Trojaborg W & Jorgensen EO (1973). Evoked cortical potentials in patients with “isoelectric” EEGs. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **35**, 301–309.
- Waters J & Helmchen F (2006). Background synaptic activity is sparse in neocortex. *J Neurosci* **26**, 8267–8277.
- White PF, Johnston RR & Eger EI 2nd (1974). Determination of anesthetic requirement in rats. *Anesthesiology* **40**, 52–57.
- Wilent WB & Contreras D (2004). Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J Neurosci* **24**, 3985–3998.
- Williams MS, Altwegg-Boussac T, Chavez M, Lecas S, Mahon S & Charpier S (2016). Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model. *J Physiol* **594**, 6733–6751.
- Williams MS, Lecas S, Charpier S & Mahon S (2020). Phase-dependent modulation of cortical and thalamic sensory responses during spike-and-wave discharges. *Epilepsia* **61**, 330–341.
- Wu XS, Sun JY, Evers AS, Crowder M & Wu LG (2004). Isoflurane inhibits transmitter release and the presynaptic action potential. *Anesthesiology* **100**, 663–670.
- Yang J & Zorumski CF (1991). Effects of isoflurane on N-methyl-D-aspartate gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci* **625**, 287–289.
- Young GB (2000). The EEG in coma. *J Clin Neurophysiol* **17**, 473–485.
- Zhao W, Zhang M, Liu J, Liang P, Wang R, Hemmings HC & Zhou C (2019). Isoflurane modulates hippocampal cornu ammonis pyramidal neuron excitability by inhibition of both transient and persistent sodium currents in mice. *Anesthesiology* **131**, 94–104.
- Zhu JJ & Connors BW (1999). Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurophysiol* **81**, 1171–1183.

Additional information

Data availability statement

All relevant data are within the article.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

S.C., S.M. and A.C.L. designed the research. A.C.L. performed the experiments and analysis of intra- and extracellular data. M.C. performed time-frequency map analysis. S.C., S.M. and A.C.L. participated in the interpretation of the results. S.L. performed the histological processing. S.C. and S.M. wrote the article and A.C.L., S.L. and M.C. revised it. All authors have approved the final version of the article and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This work was supported by grants from the Sorbonne University (Emergence-2019), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche ANR-16-CE37-0021 2016 and the Investissements d’avenir ANR-10-IAIHU-06.

Acknowledgements

Part of this work was carried out on the Histomics platform of the ICM and we thank all technical staff involved.

Keywords

cortex, *in vivo* intracellular recordings, isoflurane, somatosensory evoked potentials, thalamus

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Statistical Summary Document

2.2 Article 2: Identifying the neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia

2.2.1 Rappel du contexte de la recherche

J'ai ensuite poursuivi mes recherches sur les différentes étiologies et corrélats fonctionnels du coma isoélectrique en contribuant à l'établissement d'un nouveau modèle non-pharmacologique d'état isoélectrique induit par une anoxie cérébrale. Contrairement aux modèles d'anoxie terminale décrits dans la littérature (Borjigin et coll., 2013; van Rijn et coll., 2011), ce nouveau modèle expérimental d'anoxie cérébrale a la particularité d'être réversible, l'arrêt de l'oxygénation du cerveau étant provoquée par une interruption de la ventilation artificielle chez des rats anesthésiés et curarisés et l'oxygénation étant établie par un rétablissement de la ventilation. Ce modèle nous a ainsi permis de décrire pour la première fois les corrélats intracellulaires des changements d'activité EEG induits par l'anoxie mais aussi ceux associés aux retours des activités cérébrales lors de la réoxygénation. Lors de cette étude, j'ai également mis au point des enregistrements du diamètre et du réflexe pupillaire couplé à des enregistrements ECoG, me permettant ainsi de suivre de façon non-invasive la progression du processus anoxique dans l'activité corticale de fond et d'y associer un indicateur fiable du fonctionnement du tronc cérébral.

2.2.2 Matériel et Méthodes

2.2.2.1 Préparation des animaux et chirurgie

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives de l'Union Européenne (directive 2010/603/EU) et ont reçu l'accord conjoint du Ministère de la Recherche (APAFIS n° : 2019051019017280) et du comité d'éthique Charles Darwin. Les méthodes de préparation des rats Sprague-Dawley et de chirurgie sont détaillées dans le chapitre précédent.

2.2.2.2 Enregistrements électrophysiologiques multi-échelles

Les méthodes d'enregistrement des activités EEG et intracellulaires sont décrites dans le précédent chapitre précédent. Le potentiel *DC* extracellulaire a été enregistré simultanément à l'aide d'une microélectrode remplie de potassium actétate 2 M (60 – 70 M Ω), à proximité (300

μm) des neurones corticaux enregistrés dans S1. Les signaux correspondants ont été filtrés entre 0 et 3 kHz puis digitalisés à 10 kHz.

2.2.2.3 Procédure d'asphyxie, de récupération et segmentation des différents états

Les paramètres physiologiques et électrophysiologiques étaient enregistrés en continu durant les périodes normoxiques (contrôles), d'interruption de l'apport d'oxygène et durant tout le processus de récupération. L'asphyxie était induite par l'arrêt soudain de la ventilation artificielle chez les animaux curarisés (Vent. Off) ce qui entraînait un effondrement rapide de l' EtCO_2 et à une chute plus progressive de la SpO_2 vers des valeurs indétectable ($< 20\%$ ou $< 10\text{mm Hg}$ de pression en O_2 ce qui correspondait au seuil de détection du matériel utilisé pour le monitoring des constantes physiologiques). Après l'induction de l'anoxie, les activités cérébrales se modifiaient jusqu'à l'obtention d'un silence électro-cérébral prolongé, défini en tant que période isoélectrique (Iso) et l'apparition de l'onde de la mort (voir Chapitre 1.3.5.3). La ventilation artificielle était ensuite restaurée pour réanimer les animaux (Vent. On), procédure qui entraînait un regain progressif des activités ECoG et intracellulaires. Le début de la période de récupération était défini comme l'instant auquel le signal ECoG récupérait 95 % de son amplitude normoxique, indépendamment de son contenu fréquentiel. Les périodes de récupération suivantes étaient délimitées en fonction de leur délai relatif par rapport à la restauration de l'apport en oxygène (+15 min, +30 min, +45 min, +60 min après Vent. On).

2.2.3 Principaux résultats

Par nos enregistrements électrophysiologiques multi-échelles couplé au suivi en temps réel des paramètres physiologiques, nous avons démontré que l'anoxie cérébrale entraîne une séquence de patterns d'activité synaptique et de décharge des neurones dans le néocortex. Environ 1 min après la suppression des activités spontanées, les neurones corticaux se dépolarisent brutalement jusqu'à une valeur de potentiel membranaire où la décharge de PAs spontanée et l'excitabilité cellulaire sont abolies. Nous avons prouvé que cet état de dépolarisation n'est pas associé à une mort neuronale irréversible puisque le recouvrement de la polarisation de membrane peut être induit par une réoxygénation rapide. La repolarisation de la membrane est associée à une récupération des propriétés intégratives suivie d'un regain d'activité synaptique et de décharge dans les neurones et réseaux corticaux. La dépolarisation anoxique des neurones et son corollaire obtenu par réactivation de la ventilation artificielle résultent respectivement en

d'amples DC shifts extracellulaires négatifs et positifs qui sont reflétés dans l'ECOG par des ondes polyphasiques stéréotypées : l'onde de la mort (OdM) et l'onde de la réanimation (OdR).

En contraste avec l'EEG isoélectrique qui ne fournit pas d'informations explicites sur l'excitabilité neuronale et sur les délais de survenue des effets cytotoxiques de l'anoxie, nos résultats démontrent que l'OdM et l'OdR fournissent des biomarqueurs fiables et enregistrables de manière non-invasive de l'induction et de la récupération des altérations pathologiques de l'excitabilité neuronale. Ces deux ondes pourraient aider à raffiner les procédures thérapeutiques d'urgence car ils représentent respectivement des marqueurs pathophysiologiques en temps réel de l'initiation du processus de mort dans le cerveau (OdM) et d'un pronostic positif de récupération neurophysiologique (OdR).



Identifying neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia

Adrien E. Schramm^a, Antoine Carton-Leclercq^a, Shana Diallo^a, Vincent Navarro^{a,b}, Mario Chavez^a, Séverine Mahon^{a,1}, Stéphane Charpier^{a,c,1,*}

^a Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, INSERM UMRS 1127, CNRS UMR 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France

^b Epilepsy Unit, Clinical Neurophysiology Department, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France

^c Sorbonne University, UPMC Université Paris 06, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords

Brain anoxia
Dying
Resuscitation
Near-death experience
Neocortex
Neuronal excitability

ABSTRACT

We developed a new rodent model of reversible brain anoxia and performed continuous electrocorticographic (ECoG) and intracellular recordings of neocortical neurons to identify in real-time the cellular and network dynamics that successively emerge throughout the dying-to-recovery process. Along with a global decrease in ECoG amplitude, deprivation of oxygen supply resulted in an early surge of beta-gamma activities, accompanied by rhythmic membrane depolarizations and regular firing in pyramidal neurons. ECoG and intracellular signals were then dominated by low-frequency activities which progressively declined towards isoelectric levels. Cortical neurons during the isoelectric state underwent a massive membrane potential depolarizing shift, captured in the ECoG as a large amplitude triphasic wave known as the “wave-of-death” (WoD). This neuronal anoxic depolarization, associated with a block of action potentials and a loss of cell integrative properties, could however be reversed if brain re-oxygenation was rapidly restored (within 2–3.5 min). The subsequent slow repolarization of neocortical neurons resulted in a second identifiable ECoG wave we termed “wave-of-resuscitation” since it inaugurated the progressive regaining of pre-anoxic synaptic and firing activities. These results demonstrate that the WoD is not a biomarker of an irremediable death and unveil the cellular correlates of a novel ECoG wave that may be predictive of a successful recovery. The identification of real-time biomarkers of onset and termination of cell anoxic insult could benefit research on interventional strategies to optimize resuscitation procedures.

1. Introduction

Elucidating the neuronal events subtending the dying process during brain anoxia – the ultimate cause of death (Laureys, 2005) – and those occurring during the regaining of cerebral functions when a timely resuscitation procedure is initiated, is among the most challenging issues of clinical neurology and neurosciences.

Previous studies addressing this question in animal models of global brain anoxia have identified sequential changes in cortical electroencephalographic (EEG) patterns during the dying process. For example, inducing an abrupt cardiac arrest in rats by intra-cardiac

injection of potassium chloride led to a fast decline in EEG amplitude associated, within the first 30 s preceding the isoelectric line, with a surge of widespread high-frequency gamma oscillations (Borjigin et al., 2013). In another cardiac arrest rodent model, wherein anoxia was induced by an interruption of the artificial ventilation, the attenuation of EEG activity towards the isoelectric state was accompanied by a decreased power in all frequency bands and an increased functional connectivity between bilateral frontal cortices (Lee et al., 2017). Interruption of cerebral blood flow by decapitation in rats also resulted in a rapid loss of global EEG power, occasionally associated with slow waves or low amplitude fast activity (Vanderwolf et al., 1988; van Rijn

Abbreviations: AP, action potential; CV, coefficient of variation; ECoG, electrocorticogram; EEG, electroencephalogram; EtCO₂, end-tidal carbon dioxide concentration; ISI, inter-spike interval; M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; SpO₂, arterial oxygen saturation; Vm, membrane potential; Rm, membrane resistance; τm, membrane time constant; WoD, wave-of-death; WoR, wave-of-resuscitation

* Corresponding author at: Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, INSERM UMRS 1127, CNRS UMR 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France.

E-mail address: stephane.charpier@upmc.fr (S. Charpier).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101733>

Received 19 September 2019; Received in revised form 29 November 2019; Accepted 6 December 2019

Available online 10 December 2019

0301-0082/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

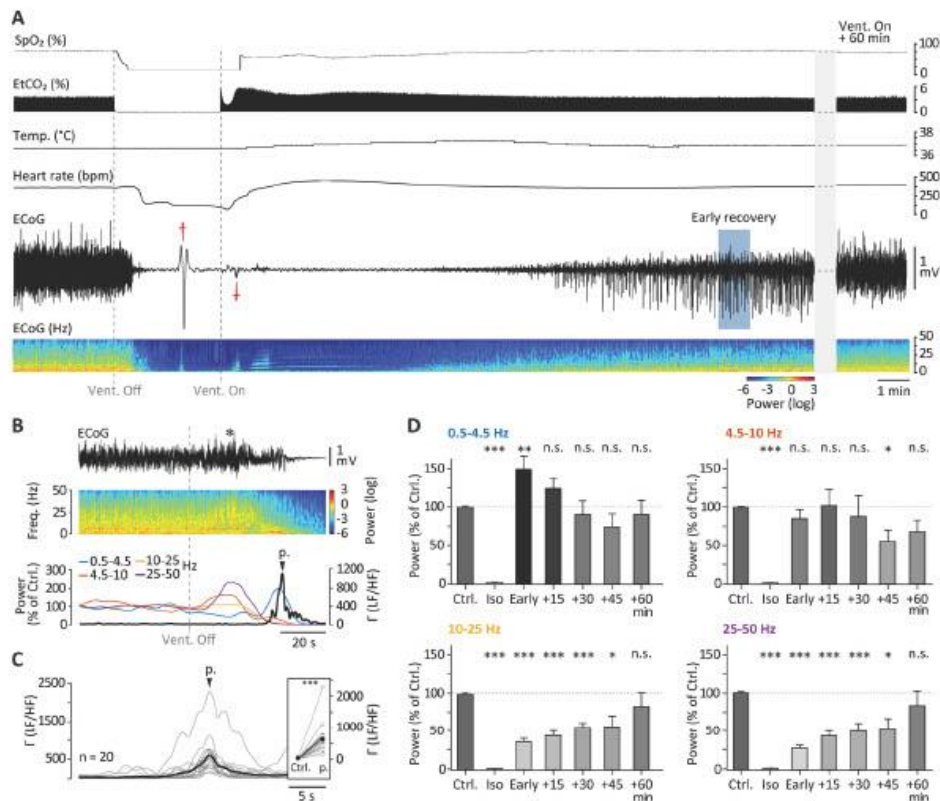


Fig. 1. Time-dependent changes in S1 ECoG activity from asphyxia onset to recovery of a pre-anoxic cortical state. (A) Typical ECoG recording from the left S1, together with the monitoring of oxygen saturation (SpO₂), end-tidal carbon dioxide concentration (EtCO₂), core temperature (Temp.) and heart rate, during pre-asphyxia period, oxygen deprivation and throughout the process of recovery. The interruption of the artificial ventilation (Vent. Off) and its restoration (Vent. On) are indicated by the vertical dashed lines. A time-frequency map of the ECoG signal is provided below the ECoG record. Recordings are discontinued (horizontal dashed lines) to properly illustrate the recovery of cortical activity 60 min after Vent. On. The blue box indicates the time period corresponding to a 95% recovery of the full amplitude of ECoG signal (Early recovery). Here, and in the following figures ↑, and ↓ indicate the WoD and the WoR, respectively. (B) Expansion of an ECoG epoch prior to, and after, interruption of the ventilation (Vent. Off) and corresponding time-frequency map. The graph below indicates the relative power of the different frequency bands (normalized as a function of their mean control value computed over a 2-min period) over time. Note the surges of high-frequency oscillations during the early anoxic period (asterisk), followed by a bump of low frequency (0.5–4.5 Hz) activity. The bold line represents the power ratio (Γ) of low frequencies (LF, 0.5–4.5 Hz) to merged faster components (HF, 10–50 Hz). In this experiment, the peak (p.) of LF/HF ratio after anoxia onset corresponded to an augmentation of 9,800% relative to the control value. (C) Population data showing the time-course of the LF/HF ratios, aligned to their peak values (p.) (n = 20 protocols). The bold line indicates the mean value computed over all experiments. The graph at right depicts the LF/HF ratios for individual experiments (grey lines), in control (Ctrl.) and at the peak value during asphyxia (p.). The black line connects the corresponding mean values (\pm S.E.M.). (D) Summary data illustrating the mean (\pm S.E.M.) ECoG power for the different frequency bands (computed over 30 s for the isoelectric period or 1 min for the other states, and normalized to a 2-min control period) in control (Ctrl., n = 20 protocols), isoelectric state (Iso, n = 20 protocols), early recovery period (Early, n = 20 protocols), as well as +15 min (n = 16 protocols), +30 min (n = 10 protocols) and +45–60 min (n = 5 protocols) after restoration of oxygen supply. Time-dependent changes in ECoG power were normalized as a function of the corresponding control value. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s. non-significant. Paired Student t-tests for all comparative measurements. Records in (A) and (B) are from two different experiments.

et al., 2011; Kongara et al., 2014). Around a minute after decapitation, during the electro-cerebral silence, a slow and large amplitude polyphasic wave was suddenly detected on the EEG. This wave was suggested to mark the synchronous and irreversible death of neurons and therefore named the “wave-of-death” (WoD) (van Rijn et al., 2011; see also Fig. 2 in Kaminogo et al., 1998). Based on a biophysical single-cell model, Zandt et al. (2011) proposed that the WoD would reflect the massive and simultaneous depolarization of a large number of neurons, caused by a cascade of oxygen deprivation-gated neuronal mechanisms initiated by the dysfunction of the ATP-dependent sodium-potassium

pumps and the loss of neuronal transmembrane potential (Lipton, 1999; Shimoda and Polak, 2011).

Similar observations were made from critically-ill patients receiving palliative care. By means of EEG-derived multivariate indexes, a transient rise in activity, presumed to represent high-frequency brain signals, was identified within 1–2 min after cardiac arrest (Chawla et al., 2009, 2017; Auyong et al., 2010). This finding, suggesting the persistence in the dying brain of activity patterns generally associated with conscious waking state (Seth et al., 2005), led to the hypothesis that end-of-life surges of electrical activities could provide a neuronal basis

to the near-death experiences (NDEs) (Chawla et al., 2009, 2017) – these vivid mental experiences reported by many cardiac arrest survivors (van Lommel et al., 2001). A propagating polyphasic EEG wave, considered as a terminal spreading depolarization analogous to the rodent WoD, was also recently detected during the dying process in patients with devastating brain injury after withdrawal of life-sustaining treatments (Dreier et al., 2018).

The neuronal origins of these near-death brain electrical activities recorded *in vivo* remain unknown, since previous human and animal studies were limited to their observation in the EEG. In addition, the lethal protocols used in rodent models have precluded an examination of the neuronal recovery process during resuscitating procedures. Here, by combining simultaneous recordings of arterial blood gases, heart rate, electrocorticographic (ECoG) potentials, intracortical direct current (DC) shift and neocortical neurons intracellular activity in a rodent model of transient anoxia, we provide the first *in vivo* characterization of the cellular and synaptic changes subtending the ECoG dynamics that successively emerge throughout the anoxic period and subsequent resuscitation process. We also demonstrate that the anoxic depolarization of neocortical neurons causing the WoD can be reversed and identify a new relevant ECoG wave, the “wave-of-resuscitation” (WoR), which inaugurates the recovery of neuronal and network activities following a timely re-oxygenation of the brain.

2. Materials and methods

Experiments were carried out in accordance with the European Union guidelines (directive 2010/63/EU) and received approval (n° 2019051019017280) from the French Ministry for Research and the Charles Darwin Ethical Committee on Animal Experimentation (C2EA-05). Every precaution was taken to minimize stress, suffering and the number of animals used in each series of experiments.

2.1. Animals, surgery and assessment of physiological conditions

Adult male Sprague Dawley rats (n = 29; Charles River Laboratories), weighting 300–500 g, were initially anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (27 mg/kg; Centravet) and ketamine (25 mg/kg; Centravet) to perform the surgical procedures. The animals were then cannulated after incision of the trachea and placed in a stereotaxic frame. Incisions and pressure points were repeatedly infiltrated with lidocaine (2 %; Centravet) and the core temperature was stabilized (36.5–37.5 °C) throughout the experiment using a feedback-controlled heating blanket. For subsequent ECoG, extracellular and intracellular recordings, small craniotomies were made above left and right primary somatosensory (S1) cortices and left primary motor (M1) cortex. After surgery, animals were paralyzed by intramuscular injection of gallamine triethiodide (40 mg/2 h; Sigma-Aldrich) and kept under artificial ventilation with room air at a rate of 85 cycles/min, a breath volume of 2.6 ml/cycle and an inspiratory pressure of 12 mbar. Anesthesia was then maintained during recordings by regular injection of pentobarbital (11 mg/kg/h, ip). Pulse oximetry, capnography and cardiopulmonary parameters were continuously assessed with a veterinary vital signs monitor (LifeWindow unit, Digicare). During control periods, the arterial oxygen saturation (SpO₂) and end-tidal carbon dioxide concentration (EtCO₂) values ranged between 95–98 % and 4–5.5 %, respectively, and the heart rate was of 350–450 beats/min (Fig. 1A). Brainstem functions were evaluated by examining the pupillary state, and its responsiveness to light, during the different phases of the asphyxial and resuscitation procedures (Fig. 2). A video camera, embedded into a stereomicroscope (Leica Microsystem), was focused on the left eye and video records were synchronized with ECoG monitoring. The pupillary state was alternatively assessed in dark (1 min), and during illumination (2 min) using a 30 W spot light located at 10 cm from the eye (n = 15 protocols from 7 rats). In four experiments, the pupillary reflex was further tested by

repeatedly shining light on the left eye.

2.2. Electrophysiology and data acquisition

ECoG activities were captured using silver electrodes (≈ 60 k Ω) placed on the dura above S1 and M1, and a reference electrode apposed on a temporal muscle of the opposite side of the head. ECoG recordings were made from left S1 (7–8 mm anterior to the interaural line, 4.5–5.5 mm lateral to the midline) in isolation or from bilateral S1 together with the left M1 (10–11 mm anterior to the interaural line, 2.5 mm lateral to the midline) (Paxinos and Watson, 1986). ECoG signals were amplified with a differential AC amplifier (Model 1700, A-M Systems), bandpass filtered at 0.1 Hz–1 kHz and digitized at 3 kHz (CED 1401plus, Cambridge Electronic Design). Current-clamp intracellular recordings were performed simultaneously with ECoG monitoring using glass micropipettes filled with 2 M KAc (60–70 M Ω) and amplified with a 900A amplifier (Molecular Devices) operating in bridge mode. Cortical neurons (n = 12) were located in the layers 5/6 of S1 (890–1572 μ m below the cortical surface; Paxinos and Watson, 1986) and identified as pyramidal cells on the basis of their distinctive electrophysiological properties (Steriade, 2004). Extracellular DC potentials were obtained in S1 from the vicinity (≈ 300 μ m) of the simultaneously intracellularly recorded cortical neurons. DC and intracellular signals were bandpass filtered (between DC and 3 kHz) and digitized at 10 kHz.

2.3. Asphyxial-resuscitation procedures and states segmentation

Physiological parameters and electrophysiological activities were continuously recorded during normoxic periods (control), during interruption of oxygen supply and throughout the resuscitation process. Asphyxia was induced by a sudden interruption of artificial ventilation in the curarized animals (Vent. Off). This led to a rapid collapse of EtCO₂ concentration and a more progressive fall down of SpO₂ values towards undetectable values (< 20 % or < 10 mm Hg of oxygen pressure, corresponding to the threshold sensibility of the LifeWindow veterinary monitor) (Fig. 1A). After anoxia onset, electrical brain activities experienced transitional changes towards a sustained electrically-silent state, defined as the isoelectric period (Iso). Ventilation was then restored to resuscitate the animals (Vent. On). This procedure initiated a progressive regaining of ECoG and neuronal activities. We defined the start of the recovery period (“early recovery”) as the time point at which the ECoG signal had recovered 95 % of its full amplitude, regardless of its frequency content. Subsequent recording periods were segmented according to their relative timings to the return of oxygen supply (+15 min, +30 min, +45 min, +60 min after Vent. On). Some of the animals (n = 12) were subjected to multiple asphyxial protocols, each protocol being separated from each other by a period of ECoG recovery.

2.4. Data analysis

Average membrane potential (Vm) values were calculated as the mean of the distribution of subthreshold intracellular activity and the amplitude of Vm fluctuations corresponded to the standard deviation of the distribution (SD Vm). Apparent membrane resistance (Rm) was measured from voltage responses to injection of negative current pulses (–0.5 to –1 nA, 100 ms duration) applied at 5 Hz and the membrane time constant (τ_m) was derived from an exponential decay fit applied to the current-induced hyperpolarizations (Schramm et al., 2014). The mean spontaneous firing rate and mean Vm of cortical neurons were extracted from representative recording periods of 30–60 s and the temporal variability of AP discharge was assessed by calculating the inter-spike intervals coefficient of variation (CV2 ISIs), which is less dependent on variations in average firing rates than the standard CV (Altwegg-Boussac et al., 2014).

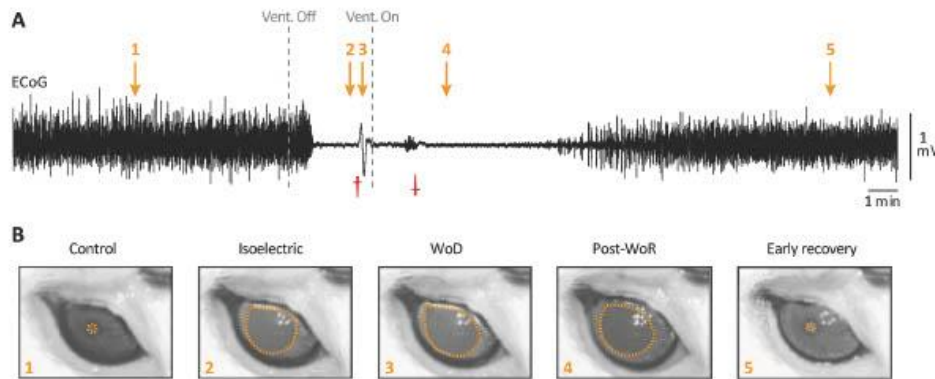


Fig. 2. Time course of changes in the pupillary state during brain anoxia and resuscitation. (A) S1 ECoG profile during an asphyxia protocol and the subsequent recovery process. Grey dashed lines indicate the times at which ventilation was turned off (Vent. Off) and reinstated (Vent. On). (B) Instantaneous video pictures taken from the illuminated left eye (see Materials and methods) at the times indicated by the arrows in (A). Note the constriction of the pupil in response to light under normoxic condition (1) and the large non-reactive mydriasis during the anoxic isoelectric ECoG (2), which reached a climax in conjunction with the WoD (3). This mydriatic state and the associated lack of pupillary reflex were suggestive of a disruption of the third cranial nerve nucleus function caused by brainstem anoxia (Ritter et al., 1999). About 1 min after the occurrence of the WoR, the pupil started to re-constrict (4) and recovered its pre-anoxic state, as well as a normoxic light reflex, at the early recovery time (5).

Frequency content of ECoG signals was computed during the different brain states by performing time-frequency (TF) analysis using a wavelet decomposition analysis made with custom-written functions in Matlab (The MathWorks). An ECoG signal $x(t)$ was convolved with a complex Morlet's wavelet function defined as $w(t, f_0) = Ae^{-t^2/2\sigma_t^2} \times e^{-i2\pi f_0 t}$. Wavelets were normalized and thus $A = (\sigma_t \sqrt{\pi})^{-1/2}$. The width of each wavelet function $m = f_0/\sigma_f$ was chosen to be 7; where $\sigma_f = 1/2\pi\sigma_t$. TF contents were represented as the energy of the convolved signal: $E(t, f_0) = |w(t, f_0) \otimes x(t)|^2$, where \otimes denotes the linear convolution operator. To quantify the degree of statistical association and the time delay between ECoG signals from different cortical regions, the nonlinear correlation coefficient h^2 was calculated as a function of a time shift (τ) (Lopes da Silva et al., 1989). This index quantifies the dependency of a signal $y(t)$ on a signal $x(t - \tau)$. A piecewise linear regression curve is used to predict the signal $y(t)$ given the values of $x(t - \tau)$. The variance of $y(t)$ explained by the regression curve is called the explained variance whereas the difference with the total variance is called the unexplained variance. Thus, the nonlinear correlation ratio η^2 quantifies the reduction of variance obtained by predicting the y values on the basis of the regression curve: $\eta^2 = (\text{total variance} - \text{unexplained variance}) / \text{total variance}$. A practical implementation of this index is obtained by splitting, in a scatter plot, the values of $x(t - \tau)$ in L bins. For each bin, the average of the corresponding $y(t)$ values is calculated, the q_k points. The x value of the midpoint of each bin is called p_k . The nonlinear regression curve is then obtained by connecting the points (p_k, q_k) by segments of straight lines. The estimator of the nonlinear correlation index is computed as follows:

$$h^2(x \rightarrow y) = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \langle y \rangle)^2 - \sum_{i=1}^N (y_i - g(x_i))^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \langle y \rangle)^2}$$

where $g(x_i)$ denotes the regression curve and $\langle y \rangle$ the average of the time series y over N samples. The same procedure may be carried out by splitting the values of y into bins and computing the expected values of x . The nonlinear coefficient can take values between 0 (when X and Y are independent) and 1 (in case of a perfect dependency). If the underlying relationship is linear, the coefficient h^2 approximates the common linear correlation coefficient r^2 . In contrast with a linear correlation function, this procedure yields an asymmetric function, i.e.

$h^2(x \rightarrow y) \neq h^2(y \rightarrow x)$. As ECoG activities are not stationary, correlation indices were computed for short sliding epochs of 5 s with 80 % of temporal overlap.

2.5. Statistics

Numerical values are given as mean \pm S.E.M. Differences between groups were assessed using Kruskal-Wallis ANOVA on ranks, paired and unpaired Student's t -tests, or the non-parametric Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney rank sum test when appropriate (SigmaStat version 3.5, Systat Software Inc.). The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Time course of ECoG changes from asphyxia onset to cortical activity recovery

ECoG activity during control periods was dominated by rhythmic waves at 4–7 Hz (Figs. 1A, B and 3 A), as classically observed under pentobarbital anesthesia (Altwegg-Boussac et al., 2014, 2016; Mahon and Charpier, 2012). The interruption of artificial ventilation (Vent. Off) typically resulted in a fast decline of EtCO_2 , whereas the SpO_2 progressively attenuated until reaching undetectable values (see Materials and methods) within 20 s (Fig. 1A). ECoG signals remained unaffected for ≈ 10 s before undergoing a progressive decrease in amplitude, often preceded by a transient amplification ($n = 13$ out of 20 protocols, asterisk in Fig. 1B). Changes in the magnitude of the ECoG were accompanied by modifications in its frequency content. We analyzed the temporal evolution of four standard frequency bands (Buzsáki and Draguhn, 2004; Franssen et al., 2016): delta (0.5–4.5 Hz), theta (4.5–10 Hz), alpha-medium beta (10–25 Hz) and high beta-gamma (25–50 Hz). In 65 % of the experiments, we identified a short lasting (9 ± 1 s, from 2 to 15 s, $n = 13$ protocols) surge of activity in the 10–25 and 25–50 Hz bands within 10–35 s after interruption of the ventilation, corresponding to a mean power increase relative to the pre-anoxic period of 39 ± 10 % and 85 ± 19 %, respectively ($p < 0.01$ for both comparisons) (Fig. 1B). All frequency bands then declined towards isoelectric levels except the delta frequency band, which displayed a late transient augmentation culminating at 28–59 s

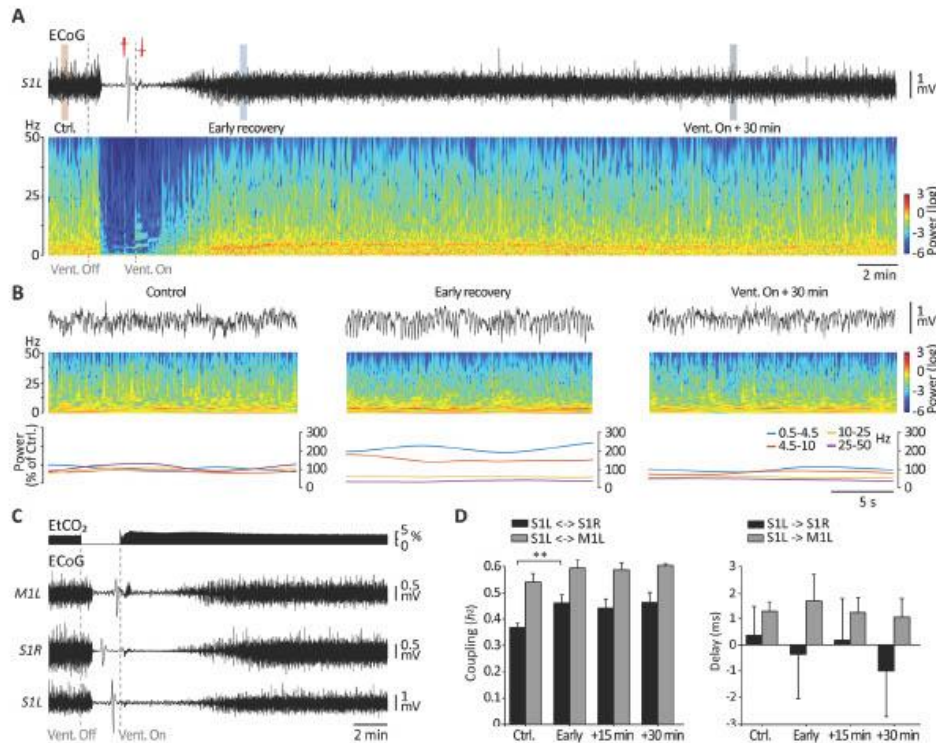


Fig. 3. Dynamics of ECoG activities and changes in functional coupling between cortical areas during resuscitation process. (A) Representative ECoG recording from left S1, during pre-asphyxia period (Ctrl.), oxygen deprivation and throughout the recovery process. The interruption of artificial ventilation (Vent. Off) and its restoration (Vent. On) are indicated by the grey dashed lines. (B) Expansion of the ECoG segments (top), as indicated by the blue boxes in (A), corresponding time-frequency maps (middle) and power of the indicated frequency bands relative to their control values. (C) Simultaneous recordings of end-tidal carbon dioxide concentration (EtCO₂) and multiste ECoGs from the indicated cortical regions, during control period, after interruption of the artificial ventilation and in the course of cortical recovery following re-oxygenation. (D) Cortico-cortical nonlinear activity coupling and associated time delays. The data are reported as mean \pm S.E.M for each computed period. Measurements were made in control (Ctrl.), during the early recovery of ECoG activities and at different periods after restoration of the ventilation. Left, The degree of coupling between cortical areas was assessed by calculating the nonlinear correlation coefficient (h^2 , see Materials and methods) extracted for successive 5-s windows with a temporal overlap of 80%. The reported values are the average of $h^2(X \rightarrow Y)$ and $h^2(Y \rightarrow X)$. Right, Corresponding time delays. The time lag values suggested a bidirectional coupling between bilateral S1 during all computed periods and a unidirectional coupling between left S1 and ipsilateral M1 with a delay around \approx 1 ms. ** $p < 0.01$. Statistical significance was assessed using paired Student t-tests.

(42 ± 1.7 s, $n = 20$ protocols) after removal of oxygen supply. This was evidenced by a marked increase (22-fold larger on average, $n = 20$ protocols, $p < 0.001$) in the low (0.5–4.5 Hz) to high frequency (merged 10–50 Hz) power ratio compared to control values (Fig. 1B and C, bold line).

The isoelectric state, achieved 49 ± 8 s (from 37 to 64 s, $n = 20$ protocols) after asphyxia onset, was characterized by a 93–98% decrease in ECoG amplitude associated with an almost complete suppression of cortical power in all frequency bands (Fig. 1A and D, Iso). This coincided with a flat membrane potential (Vm) in the simultaneously recorded neurons (see Fig. 4A and Supplementary Fig. 1A1), providing a direct demonstration of an electro-cerebral silence (Altwegg-Boussac et al., 2014, 2016, 2017). Notably, we observed that a large amplitude triphasic wave, similar to the previously described WoD (van Rijn et al., 2011), systematically emerged from the flat ECoG (red cross in Figs. 1A, 2A, 3A and 4A). The isoelectric state correlated with a drastic reduction of the heart rate, undetectable SpO₂ values (Fig. 1A) and a dilation of the animal's pupil, which reached a maximal areactive mydriasis at the time of the WoD (Fig. 2A and B).

Restoration of artificial ventilation (Vent. On), 2–3.5 min after asphyxia onset, led to a rapid raise of EtCO₂ and a slightly delayed (within 30–40 s) regaining of SpO₂ values (Fig. 1A). The return to normoxic physiological parameters correlated with the appearance of another polyphasic wave of relatively small amplitude in the ECoG (inverted red cross in Figs. 1A, 2A, 3A and 4A), which inaugurated the regaining of cortical activity and was thus called the “wave-of-resuscitation” (WoR). The early phase of ECoG signal recovery, defined as the restoration of 95% of its full amplitude, was on average achieved \approx 11 min after brain re-oxygenation and characterized by an increase in delta activity and a marked attenuation of the highest (10–50 Hz) frequency components (Figs. 1D and 3B). High-frequency oscillations then progressively resumed, approximating control values about 60 min after restoration of the ventilation (Fig. 1D). Theta activity (4.5–10 Hz) remained relatively stable, and similar to its pre-anoxic level, throughout the resuscitating process, except for a slight decrease in the corresponding ECoG power 45 min after re-oxygenation (Fig. 1D). Resuming oxygen supply also led to a progressive constriction of the dilated pupil, which returned to normal size during the early phase of

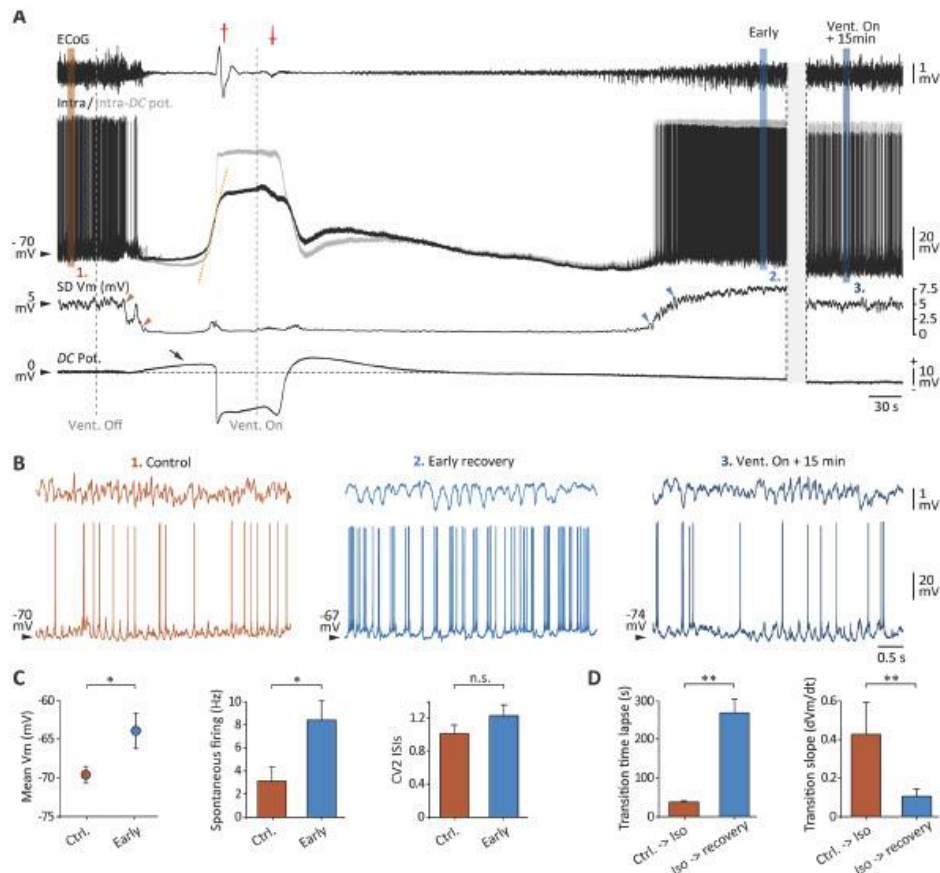


Fig. 4. Dynamic changes of neocortical neurons intracellular activity from the onset of asphyxia to the recovery of brain activity. (A) Simultaneous recordings of S1 ECoG (top), intracellular activity from a subjacent pyramidal cell (middle) and local DC potential (bottom), from control period, during oxygen deprivation, up to the recovery of cortical activity. The grey trace corresponds to the Vm corrected with the corresponding DC potential shift. The vertical dashed lines indicate the onset of asphyxia (Vent. Off) and the restoration of artificial respiration (Vent. On). The corresponding values of SD Vm are provided below the intracellular record. Recordings are discontinued to show the neuronal activity 15 min after re-oxygenation onset. The slope of the anoxic depolarizations was calculated using best linear fitting procedures (oblique orange dashed line) ($r^2 = 0.99$). (B) Enlargement of the ECoG (top) and associated intracellular segments (bottom) as indicated in (A), in control (1), during early recovery (2) and 15 min after restoration of oxygen supply (3). (C) Pooled data showing the values (mean \pm S.E.M.) of Vm ($n = 12$ neurons), spontaneous firing rate ($n = 11$ neurons) and corresponding regularity of discharge (CV2 ISIs, $n = 11$ neurons), in control (Ctrl.) and during the early phase of recovery (Early). Vm values were corrected according to the corresponding DC potential shift. (D) Summary data comparing the time lapses at the transition towards isoelectric Vm (orange arrowheads) and at the transition towards Vm recovery (blue arrowheads) (left), and the corresponding rate of Vm shifts as function of time (dVm/dt) (right). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. non-significant. Statistical significance was assessed using unpaired Student *t*-test or the non-parametric Mann-Whitney rank sum test.

ECoG recovery (Fig. 2A and B). By contrast, a lack of respiratory rescue irretrievably led to the death of the animals, as attested by a continuously flat ECoG and a cardiac arrest within 6.6–15.4 min after anoxia onset ($n = 9$ experiments).

We next quantified the cortical dynamics during resuscitation by analyzing over time the coupling properties between distant cortical areas in experiments where ECoGs were simultaneously recorded from bilateral S1 and left M1 ($n = 17$ protocols) (Fig. 3C and D). The coupling index (h^2 , see Materials and methods) values between S1 and M1 on the same hemisphere were higher than those measured from bilateral S1 ($p < 0.001$) and remained similar to control values throughout the recovery period (Fig. 3D, left). The interaction strength

between bilateral S1 ECoG signals was significantly increased at early recovery time and recovered pre-anoxic values 15 min after resuscitation onset (Fig. 3D, left). The analysis of time lags estimated from h^2 suggested a bidirectional coupling between bilateral S1 during all computed periods, whereas interactions between left S1 and M1 were characterized by a positive delay of about 1 ms (Fig. 3D, right).

3.2. Intracellular dynamics from asphyxia to cortical recovery

To elucidate the neuronal and synaptic mechanisms subtending the changes in ECoG activity throughout the anoxic and resuscitating periods, we made in a subset of experiments ($n = 12$) conjoint recordings

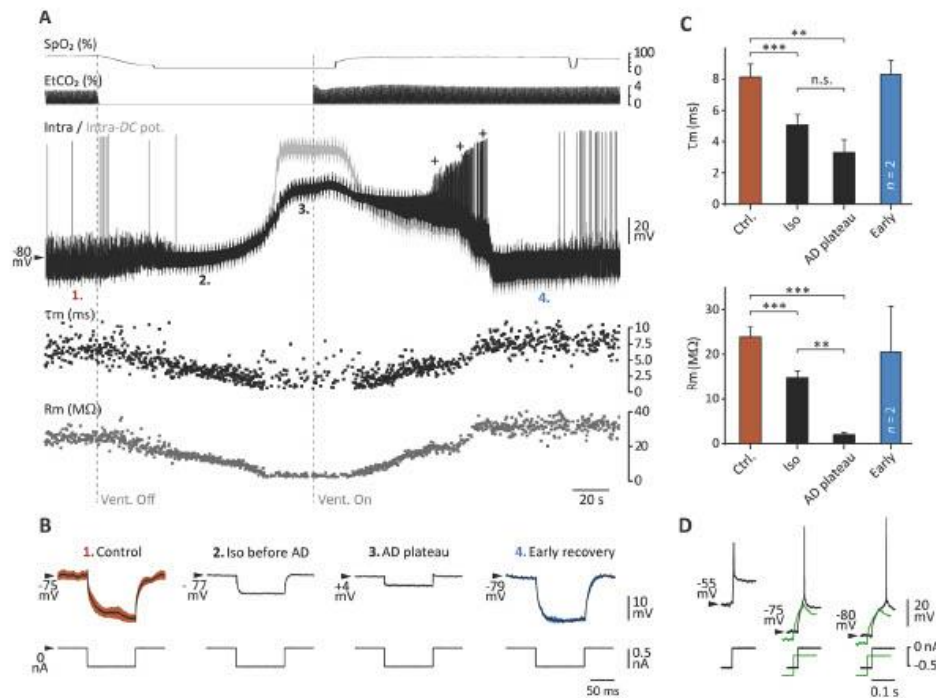


Fig. 5. Time course of changes in neuronal integrative properties. (A) Spontaneous activity and voltage responses of a S1 pyramidal neuron to iterative injections of square negative current pulses in control, during anoxia period (edged by the dashed lines) and in the course of cortical recovery. The simultaneously recorded oxygen saturation (SpO_2) and end-tidal carbon dioxide concentration ($EtCO_2$) are shown at the top. The grey trace is the V_m corrected by the adjacent DC potential (not shown). The data points below the intracellular record indicate the values of R_m and τ_m over time. (B) Mean ($n = 10$ successive trials) V_m changes (\pm S.E.M) in response to negative current pulses (bottom), at the times indicated in (A): in control (1), during the isoelectric state before the anoxic depolarization (AD) (2), during the neuronal AD plateau potential (3) and at the early recovery time (4). Note the complete lack of variability in current-evoked membrane voltage deflections during the anoxic epochs (2 and 3). (C) Summary data comparing the values of R_m and τ_m calculated from the periods indicated in (B). (D) Examples of sub- (green) and supra-threshold (black) depolarizing responses at the termination of the hyperpolarizing current pulses, during the post-anoxic cell repolarization (crosses in (A)). The V_m values at current pulses offset are indicated. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, n.s. non-significant. Significance was assessed using paired and unpaired Student t -tests.

of left S1 ECoG, intracellular activity of subjacent pyramidal neurons and extracellular DC potential from the vicinity of the intracellular electrode (Fig. 4A). Pyramidal cells, electrophysiologically-identified as regular-spiking ($n = 9$) or intrinsic bursting ($n = 3$) neurons (Steriade, 2004), displayed in control a sustained background synaptic activity resulting in a mean V_m of -69.6 ± 1.1 mV ($n = 12$ neurons), and a relatively low (3.1 ± 1.3 Hz, $n = 11$ active neurons) and irregular (CV2 ISIs = 1.0 ± 0.1 , $n = 11$ active neurons) firing activity (Fig. 4A–C). The surge of high-frequency ECoG activity that immediately followed the interruption of oxygen supply was associated in pyramidal neurons with ample rhythmic depolarizing potentials, leading to an elevated and more regular firing compared to control periods (Fig. 4A and Supplementary Fig. 1A–C). These large V_m fluctuations were individually composed of small amplitude high-frequency (from 100 to 140 Hz) events, presumably of synaptic origin, which correlated with the fast oscillations in the corresponding ECoG (Supplementary Fig. 1C). During the subsequent low-frequency ECoG pattern, cortical neurons displayed slow composite membrane depolarizations that progressively attenuated in amplitude and frequency, causing a marked decrease in spontaneous firing (Fig. 4A and Supplementary Fig. 1A2, right). This vanishing of intracellular activity ended into an isoelectric V_m , deprived of any synaptic and firing events

(Fig. 4A and Supplementary Fig. 1A1). The associated extracellular DC potential displayed a slow positive shift (Fig. 4A, oblique arrow), known to mirror an early anoxia-dependent increase in extracellular K^+ (Hansen, 1985; Xie et al., 1995). The correction of V_m with extracellular DC potential values indicated an enhancement of membrane polarization by 1–6 mV (Fig. 4A, grey line).

During the isoelectric state (58–114 s after ventilation arrest), cortical neurons exhibited a sudden sharp depolarization (2.4 ± 0.3 mV/s, $n = 12$ neurons) (Fig. 4A, oblique dashed line) that coincided with an abrupt negative deflection in the adjacent DC potential and the manifestation of the WoD in the ECoG (Figs. 4A and 6 A1). Membrane potential shift resulted in an anoxic depolarization in pyramidal neurons (Figs. 4A and 6 A1), reaching a plateau value of -22.0 ± 3.5 mV without applying the DC correction and -3.4 ± 3.4 mV ($n = 12$ neurons) after correction (grey traces in Figs. 4A and 6 A1), demonstrating an almost complete loss of transmembrane ion gradients. The neuronal anoxic depolarization, the associated isoelectric ECoG and the negative DC potential shift were maintained until the restoration of oxygen supply (Fig. 4A). This provides the first *in vivo* description of the intracellular counterpart of the anoxia-induced DC shift (Kovac et al., 2018) in the neocortex.

Resuming ventilation resulted in a slow repolarization of cortical

neurons (1–38 s after Vent. On), which systematically correlated in time with the occurrence of the WoR (Figs. 4A and 6B1). After dropping to a maximal level of membrane polarization, cortical neurons were engaged in a recovery of their activity characterized by a progressive intensification of the synaptic drive that paralleled the return of ECoG waves (Fig. 4A and B). The return of background synaptic activity in cortical neurons was much slower ($p < 0.01$) than its loss and a few minutes (3.3–6.1 min) were necessary to retrieve pre-anoxic values of Vm fluctuations after restoration of oxygen supply (Fig. 4A, arrowheads and D). The early phase of ECoG recovery was associated with a change in the firing dynamics of cortical neurons, which exhibited a significantly higher spike rate and a more bursty firing profile (CV2 values > 1 in each cell; Wilbur and Rinzel, 1983), driven by rhythmic synaptic depolarizations in phase with the augmented low-frequency waves in the ECoG (Fig. 4B and C). Fifteen minutes after restoration of oxygen supply, cortical cells experienced a decrease in their ongoing firing rate towards pre-anoxic levels and a restoration of their regular-spiking pattern (Fig. 4B). Finally, in the two neurons that could be intracellularly recorded for duration > 15 min, we found that Vm, SD Vm and spontaneous firing rate fully recovered values similar to those measured in control (data not shown).

3.3. Integrative properties of cortical neurons during anoxic and recovery process

We next investigated how the integrative properties of neocortical neurons, i.e. their ability to process membrane currents, were affected in the course of the dying-to-recovery process. We applied continuous series of negative current pulses ($n = 5$ neurons) (Fig. 5A) and measured the neuronal membrane input resistance (R_m) and time constant (τ_m), which respectively govern the ability of synaptic currents to displace Vm and the efficacy with which a cell summates synaptic events in time. As exemplified in Fig. 5A, both cellular parameters started to decline in parallel after interruption of the ventilation, falling to 61.5 % (R_m) and 61.4 % (τ_m) of control values at the establishment of the isoelectric Vm. R_m and τ_m values then continued to decrease and reached a maximal attenuation at the apogee of the anoxic depolarization (Fig. 5A–C). The progressive neuronal repolarization that followed the restoration of oxygen supply coincided with incremental values of R_m and τ_m , which fully regained their pre-anoxic levels when synaptic activity started to recover (Fig. 5A–C). Interestingly, we found that post-anodal depolarizing response and firing could be generated at the termination of negative current pulses during the latest part of the anoxic depolarization and in the course of membrane repolarization (Fig. 5A and D). This indicates that the regaining, during the early phases of resuscitation, of neocortical neurons intrinsic excitability could precede by more than 1 min the reappearance of synaptic and ECoG activities.

3.4. Spatiotemporal properties and intracortical correlates of the WoD and the WoR

We further examined the spatiotemporal properties and cellular correlates of the two major ECoG waveforms – the WoD and the WoR – we identified as respective cortical signatures of the beginning of, and recovery from, anoxic depolarization. By means of multi-site ECoG recordings, we found that the WoD could be recorded at spatially separated sites in the same hemisphere (left S1 and M1) as well as from homologous areas in both hemispheres (bilateral S1) (Figs. 3C and 6A1). The averages of the WoDs recorded at each cortical site demonstrated a very consistent shape, consisting of a large amplitude triphasic, initially positive, wave (Fig. 6A2). Quantification performed on the whole set of protocols indicated that the WoD latency did not significantly differ between the different cortices (from 70 to 164 s after asphyxia onset, $n = 32$ anoxia protocols, $p = 0.2$) (Fig. 6A3). However, when considering only simultaneous recordings of the left S1 and M1

ECoGs, we found that in ≈ 76 % of the cases the WoD in S1 preceded the WoD in M1 by 10.1 ± 1.6 s ($n = 17$ anoxia protocols) (Fig. 6A1). As illustrated in the lower part of Fig. 6A1, showing simultaneous ECoG, DC potential and intracellular recordings from the left S1, the first positive deflection of the WoD was tightly correlated with the onset of both the negative shift in DC potential ($n = 16$ anoxia protocols) and the plateau depolarization in neocortical neurons ($n = 10$ anoxia protocols). Yet, the early phase of the intracellular anoxic depolarization, measured at 20 % of its full amplitude (red dot in Fig. 6A1, lowest trace), was found to precede the corresponding ECoG WoD by $8\text{--}40$ s (-26.6 ± 3.7 s, $n = 10$ anoxia protocols, $p < 0.01$), indicating that a substantial proportion of neocortical neurons were already engaged in the anoxic insult many seconds before it could be detected as a WoD in the ECoG (Fig. 6A1 and A3).

We unequivocally identified the WoR in ≈ 61 % (16 out of 26 resuscitation protocols) of our attempts to restore brain activity after anoxia. The presence of the WoR was systematically followed by a recovery of ECoG activity and the survival of the animal. By contrast, a lack of WoR during an unsuccessful resuscitation procedure ($n = 10$) correlated with the animal's death in all cases (see Supplementary Fig. 2). The WoR had a less regular shape and a smaller amplitude than the WoD (Fig. 6A2 versus 6B2), but its average waveform computed from the different recorded areas also revealed a consistent polyphasic profile (Fig. 6B1 and B2). As illustrated in Fig. 6B1, small amplitude electrical noise was often superimposed on ECoG records at the time of the WoR. This residual artefactual signal was not caused by neuronal activity since the simultaneously recorded cells did not display any synaptic or firing events at that time (Fig. 4A and 6B1). As for the WoD, the mean delay of occurrence of the WoR after restoration of the ventilation was similar in the three cortical areas (Fig. 6B1 and B3). The physiological relevance of the WoR as a marker of neuronal recovery was attested by its robust temporal links with the abrupt positive shift in DC potential and the repolarization of cortical cells at the release of the anoxic plateau potential (Fig. 6B1, lower traces, blue dots). Compared to the WoD correlates, the restoration of the DC potential and the repolarization of cortical cells after resuming oxygen supply exhibited more variable profiles and slower kinetics (Figs. 4A, 5A and 6B2), possibly explaining the smaller amplitude of the WoR. The onset of positive DC shift and cell repolarization (measured at 20 % of the waveforms amplitude) was found to lag the corresponding ECoG WoR ($+1\text{--}38$ s for DC potential, $n = 6$ resuscitation protocols, $p = 0.13$; $+6\text{--}42$ s for Vm, $n = 6$ resuscitation protocols, $p < 0.05$) (Fig. 6B1 and B3). Thus, the WoR, which consistently preceded the restoration of pre-anoxic values of cell Vm and DC potential, could provide a faithful neurophysiological measure of an ongoing successful recovery of brain activity.

4. Discussion

4.1. Neuronal mechanisms from anoxia to resuscitation

In line with findings in human patients (Chte and Levy, 1990; Chawla et al., 2009; Pana et al., 2016) and in previous *in vivo* models of brain anoxia (Hansen, 1978; Vanderwolf et al., 1988; Silver and Erecińska, 1990; van Rijn et al., 2011; Borjigin et al., 2013; Kongara et al., 2014; Lee et al., 2017), we found that the interruption of oxygen supply led to a rapid (within 40–60 s) dissolution of ECoG signals, which was preceded by successive surges of fast and slow activities. The flattening of cortical signal was correlated with a decrease in the amplitude and frequency of synaptic potentials in the simultaneously recorded pyramidal neurons, consistent with the reduction of excitatory and inhibitory synaptic currents observed in neocortical cells after anoxia (Rosen and Morris, 1993; Peña and Ramirez, 2005). This dampening of synaptic activity likely resulted from the multiple anoxia-related presynaptic defects, including a reduction of presynaptic Ca^{2+} currents (Young and Somjen, 1992). The subsequent complete abolition

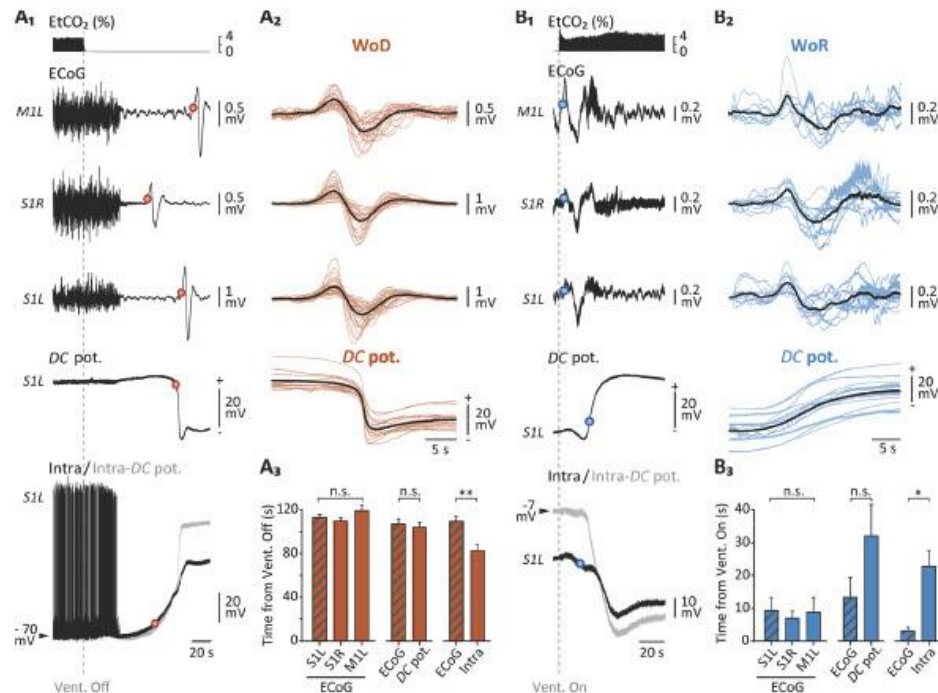


Fig. 6. Spatiotemporal properties and intracortical correlates of the WoD and the WoR. (A) WoD. (A1) Simultaneous recordings (from top to bottom) of end-tidal carbon dioxide concentration (EtCO₂), multisite ECoGs, DC potential and intracellular activity from a pyramidal neuron, during control and a 2-min period after asphyxia onset. The dashed vertical line indicates the interruption of artificial ventilation (Vent. Off). The grey trace is the Vm rectified by the corresponding DC potential shift. S1L and S1R: left and right primary somatosensory cortex, M1L: left primary motor cortex. (A2) Superimposition of individual WoDs ($n = 32$ anoxia protocols) and DC potentials ($n = 16$ anoxia protocols) recorded from the cortical areas indicated in (A1), temporally aligned on the peak of the first positive component of the WoD, or on the midpoint of DC potential negative deflection (DC pot.). The corresponding average waveforms (bold traces) are superimposed. (A3) Pooled data comparing the delays of occurrence of ECoG WoDs from the three cortical regions ($n = 32$ anoxia protocols, $p = 0.2$), S1L ECoG WoD and corresponding DC potential ($n = 16$ anoxia protocols, $p = 0.36$), and S1L ECoG WoD and neuronal anoxic depolarization ($n = 10$ anoxia protocols, $p = 0.001$) after interruption of oxygen supply. Latencies of WoD, DC shift and cell anoxic depolarization were measured at 20% of their full amplitude (red dots in (A1)). (B) WoR. (B1) Same representation as in (A1). The traces correspond to the 1.5-min recording period that followed the restoration of the ventilation (Vent. On). (B2) Same representation as in (A2) for the ECoG WoRs recorded from both S1 and left M1 ($n = 16$ resuscitation protocols). (B3) Population data comparing the delays of occurrence of ECoG WoRs ($n = 16$ resuscitation protocols, $p = 0.88$) recorded from both S1 and left M1, S1L ECoG WoR and DC potential recovery ($n = 6$ resuscitation protocols, $p = 0.13$), and S1L ECoG WoD and neuronal post-anoxic repolarization ($n = 6$ resuscitation protocols, $p = 0.01$) after restoration of oxygen supply. Latencies of WoR, DC positive shift and cell post-anoxic repolarization were measured at 20% of their full amplitude (blue dots in (B1)). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. non-significant. Statistical significance was assessed using Kruskal-Wallis ANOVA on ranks, unpaired Student *t*-test or the non-parametric Mann-Whitney rank sum test.

of synaptic activities and action potential firing in cortical neurons, including interneurons since no inhibitory synaptic potentials could be detected in pyramidal cells, resulted in a flat-line ECoG (Kroeger and Amzica, 2007; Altwegg-Boussac et al., 2014, 2017). However, this suppression of synaptic events did not cause, as theoretically expected (Destexhe et al., 2003), an increase in postsynaptic membrane resistance. This possibly resulted from an additional increase in membrane conductance due to an anoxia-induced opening of ATP-dependent K⁺ channels, as previously demonstrated *in vitro* from the same neuronal type we recorded (Fleidervish et al., 2001). This increase in K⁺ currents may also participate to the net cell hyperpolarization observed at the establishment of the isoelectric state after subtraction of the extracellular DC potential shift.

The sharp membrane depolarization that inaugurated the so-called “anoxic depolarization” was presumably due to an acute effect of oxygen deprivation on cortical neurons. The general assumption is that the rapid depletion of ATP causes a failure of membrane ATP-dependent Na⁺/K⁺ pumps, producing a massive influx of Na⁺ and efflux of

K⁺, and the correlative membrane depolarization as the membrane ion gradients are lost (Hansen, 1985; Haddad and Jiang, 1993; Martin et al., 1994; Peña and Ramirez, 2005; Shimoda and Polak, 2011). The resulting depolarizing plateau potential is, in turn, likely responsible for an opening of voltage-gated Ca²⁺ channels leading to an increase in intracellular Ca²⁺ concentration, and subsequent activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels, further increasing the membrane conductance (Silver and Erecińska, 1990, 1992). This canonic succession of cellular processes is supported by our results showing a strong parallelism between the anoxic depolarization and the shift in the local DC potential, which is known to closely match the increase in extracellular K⁺ and decrease in extracellular Na⁺ and Ca²⁺ (Hansen, 1985; Xie et al., 1995). This is also consistent with the progressive enhancement, throughout the successive phases of the anoxic depolarization, of neocortical neurons membrane conductance, as observed in the hippocampus during brain ischemia (Xu and Pulsinelli, 1996). Unlike previous *in vitro* investigations from hippocampal cells (Tanaka et al., 1997; Dzhalala et al., 2001), synaptic events or action potentials were not

systematically present during the rising phase of the anoxic depolarization. The various voltage dynamics of pyramidal neurons associated with the large depolarizing shifts could result from differences in the relative evolution of Na^+ and K^+ concentration gradients following anoxia, as recently suggested by a computer modeling study (Zandt et al., 2013).

The anoxic depolarization was maintained until artificial respiration was restored and omission of respiratory rescue irretrievably led to animal death, demonstrating that our asphyxia protocol engendered a progressively developing dying process in absence of active re-oxygenation. Restoration of the ventilation initiated a recovery of neuronal membrane potential (by resupplying the ion pumps with ATP), which consisted in a gradual repolarization with highly variable time-course from cell-to-cell. This was accompanied by a retrieval of R_m and neuronal intrinsic excitability, as attested by the current-induced post-anodal firing probably due to the recovery from inactivation of transient Na^+ channels (Kuo and Bean, 1994). The subsequent slow recovery of synaptic drive and spontaneous firing closely matched the progressive regaining of ECoG activity. This indicates that the duration (from 2 to 3.5 min) of the anoxic period investigated in the present study did not preclude – without prejudging of possible post-anoxic brain damages (Rossetti et al., 2016) – the restoration of cellular and synaptic functions, which start to recover pre-anoxic levels ≈ 60 min after reinstatement of oxygen supply.

4.2. Origin of the WoD and the WoR and their clinical significance

Asphyxia protocols were here conducted in rodents anesthetized with moderate doses of barbiturate, a pharmacological condition which could have impacted the results. However, the WoD pattern we described shares common features – including its triphasic shape, duration and latency of occurrence from the onset of brain anoxia – with that reported in awake rats after decapitation (van Rijn et al., 2011), thus excluding an anesthesia-dependent phenomenon. It is also analogous to the terminal spreading depolarization recorded in moribund patients undergoing a global cerebral ischemia following the withdrawal of life-sustaining therapies (Dreier et al., 2018). Our intracellular recordings demonstrated its consistent temporal relationship with the neuronal anoxic depolarization and the correlative local negative DC potential shift, both known to reflect the anoxia-induced loss of transmembrane ions gradients (Hansen, 1978; Xie et al., 1995). Assuming that a substantial number of cortical cells undergo anoxic depolarization in a nearly synchronous manner, as attested by the corresponding large negative DC potential shift, the raw ECoG signal is likely to approximate the summed contributions of individual neurons and the triphasic shape of the WoD to originate from the high-pass filtering of the resulting potential with a 0.1-Hz cut-off frequency (van Rijn et al., 2011; Zandt et al., 2011; Dreier et al., 2017). The collective repolarization of cortical neurons associated with a positive shift in the DC potential after restoration of oxygen supply, likely due to the restoration of ion gradients, was reflected as a second polyphasic wave in the ECoG, the WoR. The relatively low amplitude of the WoR was probably due to the high cell-to-cell variability in delay and time course of V_m recovery, resulting in smaller current flows within the cortical tissue. In most of experiments where both S1 and M1 ECoGs were simultaneously recorded, the WoD first appeared in S1. This could result from the high vulnerability to hypoxia-ischemia of this cortical region (Martin et al., 1997), which may then propagate the anoxic depolarization wave, *via* spreading depression-like processes (Bogdanov et al., 2016), to distant cortical areas.

Restoration of oxygen supply, after the occurrence of the WoD, was followed in most cases ($\approx 61\%$) by a WoR that systematically inaugurated the recovery of neuronal and ECoG activity. This suggests that the WoD cannot be considered as a biomarker of a massive neuronal death or irretrievable brain death, and thus may be more appropriately renamed “wave of anoxic depolarization”. However, we can

conclude from the present study that the WoD provides a reliable signature, in both rodents and humans, of a severe anoxic insult of neocortical neurons that can be readily recorded from the brain surface. To our knowledge, the present work is the first to describe the existence and the cellular correlates of a surface cortical wave predictive of a post-anoxic cortical recovery: the WoR. This wave represents a faithful anticipatory biomarker of successful resuscitation, which can precede by ≈ 20 s the onset of V_m recovery in individual cortical neurons. By means of appropriate EEG filtering in human patients undergoing resuscitation procedures, the identification of a WoR, or a lack of detection, may potentially participate to the prognosis of a good post-anoxic outcome or to the diagnosis of an irreversible brain deterioration.

4.3. A new neuronal basis for near-death experiences?

Our protocols of asphyxia rapidly led to the establishment of an isoelectric state, shortly preceded by successive surges of fast and slow oscillations in the ECoG. Such transient increases in brain electrical activity at near-death have been previously observed in non-anesthetized rodents after sudden brain anoxia (Vanderwolf et al., 1988; Borjigin et al., 2013) and suggested by bispectral index measurements after withdrawal of life support in human patients (Chawla et al., 2009, 2017; Auyong et al., 2010). The increase in high-frequency oscillations was interpreted as a possible correlate of a heightened conscious state that could account for NDEs (Chawla et al., 2009, 2017; Borjigin et al., 2013). Our findings challenge this hypothesis. We found that the surge of beta-gamma ECoG activities correlated in pyramidal neurons with regular firing at 6–7 Hz driven by rhythmic membrane oscillations, which were shaped by the summation of high-frequency (up to 140 Hz) depolarizing and hyperpolarizing synaptic potentials. This pattern is similar to the transient burst of fast activity previously recorded *in vivo* in hippocampal networks during cerebral ischemia (Freund et al., 1989) and shown to result from an oscillatory synaptic excitation tuned by a GABA- and adenosine-dependent inhibition (Dzhalala et al., 2001). Regardless of a possible effect of anesthesia, which however does not preclude the occurrence of NDEs (Lopez et al., 2006), the neuronal and synaptic activities we recorded in association with the increase in high-frequency ECoG oscillations differed from that of neocortical neurons during waking state, ordinarily characterized by a sustained depolarizing synaptic drive and an irregular firing (Steriade et al., 2001). Moreover, the duration of the high-frequency surge (a few seconds), as estimated by the bispectral index score in humans, is seemingly too short to explain the richness and the temporal extent of the narratives from patients who experienced NDE (Owens et al., 1990; van Lommel et al., 2001). It is also improbable that NDEs occur from the transient isoelectric brain state – and associated WoD – since we demonstrated that cortical neurons had lost their excitability and were not spontaneously active during this state, and therefore, unable to generate conscious experience.

It is conspicuous that NDE reports require successful resuscitation and recovery of cortical and cognitive functions. We found that the time necessary to recover normoxic synaptic and firing patterns in cortical neurons and networks was much longer than that corresponding to anoxia-induced activity decline, making this period more suitable to subtend NDEs. The slow process of recovery was characterized by overwhelming 5–10 Hz oscillations in the ECoG and intracellular activities, together with persisting attenuated high-frequency patterns. Comparable atypical patterns of brain oscillations, associating a decrease in gamma activities with an increase in low-frequency pattern, have been reported in hallucinatory diseases, such as schizophrenia (Uhlhaas and Singer, 2010). It is thus plausible that the long-lasting disorganization of cortical dynamics characterized by a deficit in fast ECoG activity, especially in sensory areas, be responsible for the stereotyped, hallucinatory-like (Morse et al., 1989), mental imagery that characterize some typical elements of NDEs. We thus suggest that the slow recovery of brain activities following resuscitation may represent a

relevant time period to get deeper insight into the neuronal basis of NDEs.

5. Conclusions

Our multi-scale electrophysiological recordings combined with the monitoring of vital parameters demonstrate that brain anoxia triggers a temporally-organized sequence of synaptic and firing patterns in the neocortex which ends with the establishment of an isoelectric state deprived of neuronal activity. About 1 min after the silencing of cortical activities, neocortical neurons strongly depolarize to a Vm where firing is no longer observed and cell excitability is lost. We provide evidence that this state of depolarization block does not imply irreversible neuronal death since a recovery of cell membrane polarization can be initiated if re-oxygenation is rapidly reinstated. Membrane potential repolarization upon resuscitation is accompanied by a return of cell integrative properties followed by the progressive regaining of normoxic synaptic and firing activities in neurons and networks. The anoxia-induced massive depolarization of neocortical cells and its reversal upon return of oxygen supply respectively results in large amplitude positive and negative shifts of the cortical DC potential, which can be captured as reproducible polyphasic ECoG waveforms at the surface of the brain: the WoD and the WoR.

Unlike the isoelectric EEG, which does not provide unequivocal information on neuronal excitability (Altwegg-Boussac et al., 2017) and on the timing of cytotoxic cellular processes after anoxia, the present findings demonstrate that the WoD and the WoR provide reliable and easily recordable biomarkers of the onset of, and recovery, from anoxia-related neuronal insult. Although an equivalent of the WoR has never been recorded from human patients so far, it is very likely that a collective recovery of Vm would also occur in human cortical neurons upon successful cardiopulmonary resuscitation. Therefore, the WoD and the WoR may help refine interventional emergency procedures as they could be used as a real-time pathophysiological marker of brain death initiating processes (WoD) and as a cortical signature for positive recovery prognosis (WoR). In consequence, and ultimately, these results may also have implications for ethical and clinical debates on organ donation involving dying patients.

Author contributions

A.E.S, V.N., S.M., and S.C. designed research; A.E.S. and A.C.L. performed research; A.E.S., S.D., M.C., A.C.L., and S.M. analyzed data; S.M. and S.C. supervised research and wrote the paper.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Pr L. Naccache for comments on a previous version of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Sorbonne University (Emergence-2019), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE37-0021 2016), the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC-2016), the startup Rythm and the program Investissements d'avenir ANR-10-IAIHU-06.

Appendix A. The Peer Review Overview and Supplementary data

The Peer Review Overview and Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101733>.

References

- Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Mahon, S., Charpier, S., 2014. Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J. Physiol.* 592, 3577–3595.
- Altwegg-Boussac, T., Mahon, S., Chavez, M., Charpier, S., Schramm, A.E., 2016. Induction of an isoelectric brain state to investigate the impact of endogenous synaptic activity on neuronal excitability in vivo. *J. Vis. Exp.* 31, e53576.
- Altwegg-Boussac, T., Schramm, A.E., Ballesterio, J., Grosselin, F., Chavez, M., Lecas, S., Baulac, M., Naccache, L., Demeret, S., Navarro, V., Mahon, S., Charpier, S., 2017. Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain* 140, 2381–2398.
- Auyong, D.B., Klein, S.M., Gan, T.J., Roche, A.M., Olson, D., Habib, A.S., 2010. Processed electroencephalogram during donation after cardiac death. *Anesth. Analg.* 110, 1428–1432.
- Bogdanov, V.B., Middleton, N.A., Theriot, J.J., Parker, P.D., Abdullah, O.M., Ju, Y.S., Hartings, J.A., Brennan, K.C., 2016. Susceptibility of primary sensory cortex to spreading depolarizations. *J. Neurosci.* 36, 4733–4743.
- Borjigin, J., Lee, U., Liu, T., Pal, D., Huff, S., Klarr, D., Sloboda, J., Hernandez, J., Wang, M.M., Mashour, G.A., 2013. Surge of neurophysiological coherence and connectivity in the dying brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14432–14437.
- Buzsáki, G., Draguhn, A., 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1939.
- Chawla, L.S., Akst, S., Junker, C., Jacobs, B., Seneff, M.G., 2009. Surges of electroencephalogram activity at the time of death: a case series. *J. Palliat. Med.* 12, 1095–1100.
- Chawla, L.S., Terek, M., Junker, C., Akst, S., Yoon, B., Brasha-Mitchell, E., Seneff, M.G., 2017. Characterization of end-of-life electroencephalographic surges in critically ill patients. *Death Stud.* 41, 385–392.
- Chute, H.L., Levy, W.J., 1990. Electroencephalographic changes during brief cardiac arrest in humans. *Anesthesiology* 73, 821–825.
- Destexhe, A., Rudolph, M., Paré, D., 2003. The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 739–751.
- Dreier, J.P., Major, S., Foreman, B., Winkler, M.K.L., Kang, E.J., Milakara, D., Lemale, C.L., DiNapoli, V., Hirzman, J.M., Weitzel, J., Andluz, N., Carlson, A., Hartings, J.A., 2018. Terminal spreading depolarization and electrical silence in death of human cerebral cortex. *Ann. Neurol.* 83, 295–310.
- Dreier, J.P., Fabricius, M., Ayata, C., Sakowitz, O.W., Shuttleworth, C.W., Dolmen, C., et al., 2017. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: review and recommendations of the COSBID research group. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1596–1625.
- Dzhala, V., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 2001. Neuronal mechanisms of the anoxia-induced network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 536, 521–531.
- Fleiderich, I.A., Gebhardt, C., Atzman, N., Gutnick, M.J., Heinemann, U., 2001. Enhanced spontaneous transmitter release is the earliest consequence of neocortical hypoxia that can explain the disruption of normal circuit function. *J. Neurosci.* 21, 4600–4608.
- Franzen, A., Dimitriadis, G., van Ede, F., Maria, E., 2016. Distinct α - and β -band rhythms over rat somatosensory cortex with similar properties as in humans. *J. Neurophysiol.* 115, 3030–3044.
- Freund, T.F., Buzsáki, G., Prohaska, O.J., Leon, A., Somogyi, P., 1989. Simultaneous recording of local electrical activity, partial oxygen tension and temperature in the rat hippocampus with a chamber-type microelectrode. Effects of anesthesia, ischemia and epilepsy. *Neuroscience* 28, 539–549.
- Haddad, G.G., Jiang, C., 1993. O₂ deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog. Neurobiol.* 40, 277–318.
- Hansen, A.J., 1978. The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol. Scand.* 102, 324–329.
- Hansen, A.J., 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* 65, 101–148.
- Kaminogo, M., Suyama, K., Ichikura, A., Onizuka, M., Shibata, S., 1998. Anoxic depolarization determines ischemic brain injury. *Neurol. Res.* 20, 343–348.
- Kongava, K., McIlhorne, A.E., Kells, N.J., Johnson, C.B., 2014. Electroencephalographic evaluation of decapitation of the anesthetized rat. *Lab. Anim.* 48, 15–19.
- Kovac, S., Spedtmann, E.J., Gorji, A., 2018. Uncensored EEG: the role of DC potentials in neurobiology of the brain. *Prog. Neurobiol.* 165–167, 51–65.
- Kroeger, D., Amzica, F., 2007. Hypersensitivity of the anesthesia-induced comatose brain. *J. Neurosci.* 27, 10597–10607.
- Kuo, C.C., Bean, B.P., 1994. Na⁺ channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron* 12, 819–829.
- Laureys, S., 2005. Science and society: death, unconsciousness and the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 899–909.
- Lee, D.E., Lee, L.G., Siu, D., Bazrafkan, A.K., Farahbadi, M.H., Dinh, T.J., Orellana, J., Xiong, W., Lopour, B.A., Akbari, Y., 2017. Neural correlates of consciousness at near-electrocerebral silence in an asphyxial cardiac arrest model. *Brain Connect.* 7, 172–181.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431–1568.
- Lopes da Silva, F., Pijn, J.P., Boeijinga, P., 1989. Interdependence of EEG signals - linear vs nonlinear associations and the significance of time delays and phase shifts. *Brain Topogr.* 2, 9–18.
- Lopez, U., Forster, A., Annoni, J.M., Habre, W., Iselin-Chaves, I.A., 2006. Near-death experience in a boy undergoing uneventful elective surgery under general anesthesia. *Paediatr. Anaesth.* 16, 85–88.

- Mahon, S., Charpier, S., 2012. Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J. Neurosci.* 32, 11377–11389.
- Martín, R.L., Lloyd, H.G., Cowan, A.L., 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17, 251–257.
- Martín, L.J., Brambrink, A., Kochler, R.C., Trojstman, R.J., 1997. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J. Comp. Neurol.* 377, 262–285.
- Morse, M.L., Venecia Jr., D., Milstein, J., 1989. Near-death experiences: a neurophysiologic explanatory model. *J. Near-Death Stud.* 8, 45–53.
- Owens, J.E., Cook, E.W., Stevenson, L., 1990. Features of 'near-death experience' in relation to whether or not patients were near death. *Lancet* 336, 1175–1177.
- Pana, R., Hornby, L., Shemie, S.D., Dhamani, S., Teitelbaum, J., 2016. Time to loss of brain function and activity during circulatory arrest. *J. Crit. Care* 34, 77–83.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Peña, F., Ramirez, J.M., 2005. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol. Neurobiol.* 32, 251–283.
- Ritter, A.M., Muiselaar, J.P., Barnes, T., Choi, S., Fatouras, P., Ward, J., Bullock, M.R., 1999. Brain stem blood flow, pupillary response, and outcome in patients with severe head injuries. *Neurosurgery* 44, 941–948.
- Rosen, A.S., Morris, M.E., 1992. Anoxic depression of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical slices. *J. Neurophysiol.* 69, 109–117.
- Rossetti, A.O., Rabinstein, A.A., Oddo, M., 2016. Neurological prognostication of outcome in patients in coma after cardiac arrest. *Lancet Neurol.* 15, 597–609.
- Schraam, A.E., Marinazzo, D., Gener, T., Graham, L., 2014. The Touch and Zap method for in vivo whole-cell patch recording of intrinsic and visual responses of cortical neurons and glial cells. *PLoS One* 9, e97310.
- Shimoda, L.A., Polak, J., 2011. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C951–C967.
- Seth, A.K., Barnes, B.J., Edelman, D.B., 2005. Criteria for consciousness in humans and other mammals. *Conscious. Cogn.* 14, 119–139.
- Silver, I.A., Erecińska, M., 1990. Intracellular and extracellular changes of $[Ca^{2+}]$ in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J. Gen. Physiol.* 95, 837–866.
- Silver, I.A., Erecińska, M., 1992. Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^{+}]$ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12, 759–772.
- Steriade, M., Timofeev, I., Grenier, F., 2001. Natural waking and deep states: a view from inside neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 85, 1969–1985.
- Steriade, M., 2004. Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 121–134.
- Tanaka, R., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mihara, S., Higashi, H., 1997. Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 78, 891–902.
- Uhlhaas, P.J., Singer, W., 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 100–113.
- Vanderwolf, C.H., Buzsáki, G., Cain, D.P., Cooley, R.K., Robertson, B., 1988. Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res.* 451, 340–344.
- van Lommel, P., van Waele, R., Meyers, V., Elfferich, I., 2001. Near-death experience in survivors of cardiac arrest: a prospective study in the Netherlands. *Lancet* 358, 2039–2045.
- van Rijn, C.M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S., Coenen, A.M., 2011. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. *PLoS One* 6, e16514.
- Wilbur, W.J., Rinzel, J., 1983. A theoretical basis for large coefficient of variation and bimodality in neuronal interspike interval distributions. *J. Theor. Biol.* 105, 345–368.
- Xie, Y., Zacharias, E., Hoff, P., Tegmeier, F., 1995. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 587–594.
- Xu, Z.C., Pulsinelli, W.A., 1996. Electrophysiological changes of CA1 pyramidal neurons following transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording and staining study. *J. Neurophysiol.* 76, 1689–1697.
- Young, J.N., Somjen, G.G., 1992. Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain Res.* 573, 70–76.
- Zandt, B.J., ten Haken, B., van Dijk, J.G., van Putten, M.J., 2011. Neural dynamics during anoxia and the 'wave of death'. *PLoS One* 6, e22127.
- Zandt, B.J., Stigen, T., Ten Haken, B., Netoff, T., van Putten, M.J., 2013. Single neuron dynamics during experimentally induced anoxic depolarization. *J. Neurophysiol.* 110, 1469–1475.

2.3 Article 3: Anoxic depolarization is preferentially initiated in deep layers of primary somatosensory in a rodent model of global reversible anoxia *in vivo*.

2.3.1 Rappel sur le contexte de la recherche

L'étude décrite ci-dessous est finalisée et fait l'objet d'une publication en cours de rédaction, c'est pourquoi elle est présentée en langue anglaise.

Dans cette dernière étude, pour l'instant non-publiée, j'ai raffiné la résolution spatiale des enregistrements électrophysiologiques en associant des enregistrements LFP multisites, un ECoG, des enregistrements intracellulaires et le recueil du potentiel *DC* intracortical (extracellulaire local) dans les différentes couches du cortex somatosensoriel. Les sites d'initiation de la dépolarisation anoxique (AD) au sein du néocortex sont encore sujets à de vives discussions et leur étude est éminemment dépendante des aspects méthodologiques de l'induction de l'anoxie (Bogdanov et coll., 2016; Juzekaeva et coll., 2017; Nasretidinov et coll., 2017). Nous avons donc entrepris d'étudier dans notre modèle rongeur d'asphyxie, en temps réel et à plusieurs échelles, les dynamique d'initiation et de propagation des processus anoxiques au sein de l'aire corticale initiatrice de l'AD.

Introduction

Brain anoxia, the total cessation of brain oxygenation as a consequence of cardiac arrest or asphyxia firstly leads to a surge of high frequency activity in cortical networks (Borjigin et coll., 2013) and neurons (Schramm et coll., 2020) after 10 – 20 seconds. As the cerebral metabolic rate decreases, cortical activities are dominated by low frequency oscillations (Borjigin et coll., 2013; Cunningham et coll., 2006; Hossmann and Kleihues, 1973; Lee et coll., 2017) before a progressive silencing of cortical networks and neurons (Clute and Levy, 1990; Hansen, 1978; Schramm et coll., 2020). If cerebral oxygen supplies are not restored, the electro-cerebral silence is disrupted, in the high-pass filtered EEG, by a large tri-phasic wave originally named

“wave-of-death” (van Rijn et coll., 2011) then termed “wave of anoxic depolarization” (WAD) as it is the EEG reflection of an abrupt and near-total depolarization of membrane potential of cortical neurons (Schramm et coll., 2020) following the shutting-down of Na/K ATPases (Pietrobon and Moskowitz, 2014). At this point, the timely restoration of brain oxygenation brings about the emergence of a second EEG wave recently named “wave of resuscitation” (Schramm et coll., 2020) which will be called “wave of post-anoxic repolarization” (WpAR) throughout this study as it corresponds to the repolarization of neuronal membrane potential following the recovery of Na/K ATPases activity (Schramm et coll., 2020).

Sensitivity to anoxia is not homogenous, different brain structures and cell types display different anoxia-related insults after global ischemia (Kawai et coll., 1992; Lipton, 1999). For example, after oxygen and glucose deprivation (OGD) *in vitro*, AD initiation is slower in neurons from lower brain structures such as brainstem and hypothalamus than in cortical and thalamic neurons (Andrew et coll., 2017; Brisson and Andrew, 2012; Brisson et coll., 2013). In hippocampal slices undergoing OGD, AD is initiated in CA1 pyramidal and then propagates to other hippocampal compartments (Aitken et coll., 1998). Furthermore, AD initiation sites in the same structure may differ according to methodological aspect of anoxia induction. In rats undergoing global brain anoxia *in vivo* by respiratory arrest, by breathing nitrogen or by OGD, cortical AD is initiated in L4 of the hind limb and whisker related somatosensory cortices (Bogdanov et coll., 2016; Juzekaeva et coll., 2017; Schramm et coll., 2020) while application of KCl leading to local ischemia revealed a preferential initiation of AD in layer 2/3 in several cortical areas (Kaufmann et coll., 2017; Nasretdinov et coll., 2017). In this study we addressed the issue of WAD and WpAR cortical initiation by recording LFP activity using linear 16 and 32 channels silicone probes, electrocorticographic (ECoG), extracellular DC and intracellular activities. The multi-scale recordings performed in a global and reversible brain anoxia model allowed us to evaluate the spatiotemporal dynamics of all anoxia-induced neurophysiological processes *in vivo*.

Material and Methods

Animals and experimental procedure

Animal care and manipulation were carried out in accordance with the European Committee Council Directive (2010/63/EU) and approved by the French Ministry for Research and the local Ethical Committee (APAFIS no. 18003-2019051019017280). All experiments were

performed on Sprague-Dawley rats of both sexes (X females Y males) weighting X-X g (n= Y). Anesthesia was induced by inhalation of isoflurane (3.5%; Centravet) then tracheotomy was performed. Animals were subsequently placed in a stereotaxic frame under artificial ventilation (room air, 80 breaths.min⁻¹, 2.6 – 3.3 ml.cycle⁻¹). Rats were kept under 1.5 – 2 % isoflurane during surgery in addition to neuromuscular blockade (gallamine triethiodide, 40 mg/2h i.m.; Santa-Cruz) as well as sedation and analgesia using sufentanil (3 µg.kg⁻¹ every 30 min, i.p.; Piramal). Local subcutaneous infiltrations of lidocaine 2% (Centravet) ensured total analgesia of every incision and pressure points. A small craniotomy was performed above the left primary somatosensory cortex (S1) of the animals (0.1 – 2.5 mm posterior to bregma and 3.6 – 5.9 mm lateral to the midline)(Paxinos and Watson, 2007). This allowed reliable recordings of S1 local field potential (LFP), electrocorticographic (ECoG) and intracellular neuronal activities. After completion of the surgery isoflurane anesthesia was gradually lifted (decrease 0.5 % every 10 min). Heart rate was continuously recorded to assess the depth of anesthesia. Oxygen saturation (SpO₂), core temperature (maintained at 37°C by a feedback-controlled heating blanket; Harvard Apparatus) and end-tidal CO₂ (EtCO₂) were also monitored to ensure the stability of physiological parameters(Altwegg-Boussac et coll., 2017; Schramm et coll., 2020).At the end of the experiments, animals were injected with an overdose of euthasol (40%, i.p.; Centravet) and perfused for subsequent histological evaluation of silicone probe tracks and/or recorded neurons.

Ouabain injections

After opening of the dura and positioning of recording silicone probes, a custom-made glass micropipette filled with 1 – 5 mM ouabain or PBS connected to a precision syringe was vertically lowered at $322 \pm 32 \mu\text{m}$ or $1012 \pm 89 \mu\text{m}$ bellow cortical surface with a $236 \pm 134 \mu\text{m}$ mediolateral spacing with the top extremity of the recording silicone probe. Ouabain and PBS injections of 50 – 100 nL were then performed at a 50 nL/s rate after observing a control period of at least 15 min and a 30 min to 1h recovery period between injections.

Electrophysiological recordings

LFP recordings: Experiments were performed using 16-channel silicon probes (n=10; 250 µm electrode separation distance; 35 µm site IrOx; 0.2 MΩ; Atlas Neuroengineering) or 32-channel silicon probes (n=6; 100 µm electrode separation distance; 35 µm site IrOx; 0.7 MΩ; Atlas Neuroengineering). Angle for electrode insertion was determined as perpendicular to cortical

surface tangent at insertion site. Position of each recording site was determined using penetration-related electrical artifacts in relation with electrode tip depth during insertion. LFP signals were amplified and filtered between 0.1 Hz and 6 kHz using DigitalLynx (NeuraLynx) amplifier and digitized at 32 kHz for post hoc analysis.

ECoG recordings: ECoG activity was recorded with a low impedance (~60 k Ω) silver electrode placed on the dura above S1, and a reference electrode put on the contralateral temporal muscle. Signals were amplified with a differential AC amplifier (Model 1700; A-M Systems), filtered between 0.1 Hz and 3 kHz and digitized at 3 kHz (1401, Cambridge Electronic Design).

Extracellular DC recordings: Experiments were performed using two glass micropipettes filled with 0.5M NaCl (n= 12; 10 – 26 M Ω , 3 – 8 M Ω between electrodes). Electrodes were simultaneously positioned in S1 layer 2/3 (250 – 330 μ m below cortical surface) and S1 layer 5 (900 – 1700 μ m below cortical surface) with a 300 μ m mediolateral distancing between electrodes. Signals were amplified with an Axoclamp 900A amplifier (Molecular Devices), band pass filtered between DC and 10 kHz and digitized at 10 kHz (1401, Cambridge Electronic Design).

Intracellular recordings: Experiments were performed with glass micropipettes filled with 2M KAc (55 – 80 M Ω) located in S1 layer 2/3 (300 – 900 μ m vertically bellow cortical surface) and layer 5 (1200 – 2500 μ m vertically bellow cortical surface)(Paxinos and Watson, 2007). Current-clamp recordings were amplified with an Axoclamp 900A amplifier (Molecular Devices) operating in bridge mode, bandpass filtered between DC and 10 kHz and digitized at 10 kHz (1401, Cambridge Electronic Design). Recorded cortical neurons were identified as pyramidal cells whether on-line on the basis of their intrinsic firing patterns in response to direct stimulations(Steriade, 2004) or off-line by their morphological features.

Signal Analysis

LFP recordings: Analysis were performed with a combination of Fieldtrip (release 20200919)(Oostenveld et coll., 2011) and custom-developed scripts in MATLAB (Mathworks Inc., version R2019b). Analysis of LFP were performed on a period situated between 5 min before and 10 min after cessation of artificial ventilation (Vent. Off). For WAD negative peak, Ouabain-induced WAD negative peak and WpAR positive peak detection, LFP signals were low-pass filtered at 4 Hz. Waves' amplitudes were calculated as the difference between peak voltage values and values measured 5 s before peak, amplitude values were used to determine

waves' half-width. Maximum values of WAD and Ouabain-induced WAD falling slope were measured as peak values of signals' derivatives after smoothing with a 1 s time window. WAD delays were expressed as the difference between WAD peak timing and Vent. Off while WpAR delays were expressed as the difference between WpAR peak timing and Vent. On. Ouabain-induced WAD initiation delays were expressed as the difference between wave peak timing and injection timing. Bidirectional propagation speed of WAD was calculated as the ratio of the delay difference between earliest and latest WAD or Ouabain-induced WAD in either direction by the difference between recording sites' depth. The time of occurrence of the isoelectric state was considered as the instant when LFP signal peak-to-peak amplitude crossed a threshold set as 10% of baseline and maintained its value under said threshold for at least 20 s. A Fourier transform (FFT) was computed between Vent. Off and isoelectric onset to extract relevant frequency bands, the FFT was then detrended and normalized between 0 (minimum values) and 1 (maximum values) to extract spectral power peaks. Relevant frequency bands were identified as frequencies contained in the normalized power peak. Time-frequency maps were constructed using a multitaper decomposition analysis with a sliding window of 1 s (Oostenveld et coll., 2011), power data was normalized either by using the baseline power value of each frequency (0.5 to 60.5 Hz with a 0.5 Hz step) measured by averaging power over a 2 min period prior to Vent. Off. (Fig 2 c, d) or by applying a decimal logarithm function on power data. For each selected frequency bands, baseline normalized power data was averaged over frequencies, peak value and timings were the extracted from its detrended time-course. Layer-specific maximum LFP power was derived from a pooling of maximum normalized power values at electrodes situated in histologically determined layer 2/3 and 5 of S1 (Fig. S1).

Intracellular and DC recordings: Signals were analyzed with Spike2 software (Cambridge Electronic Design, version 9.08b). Average membrane potential (V_m) of cortical neurons was calculated as the mean of the distribution of spontaneous subthreshold neuronal activity and the magnitude of V_m fluctuations was quantified as the standard deviation (σ) of the distribution (σV_m). Mean spontaneous firing rate and V_m values were extracted from recordings of at least 3 min. Repetitive current pulses (200 ms duration, repeated every 1 s, $n \geq 10$ trials per intensity) of increasing intensity (from -0.2 to -0.8 nA) were injected into cortical cells to measure membrane resistance (R_m). Measurements of voltage drops (averaged for each intensity) were made at the end of the membrane capacitance charge. Corresponding voltage-current (V-I) plots were constructed and the mean R_m was calculated as the slope of the linear portion of the V-I plot. The membrane time constant (τ_m) was derived from an exponential decay fit applied to

the initial phase of the mean ($n \geq 10$ successive trials) current-induced (-0.4 nA) hyperpolarization. Amplitude of anoxic depolarization (ΔV_m of AD) was calculated as the voltage difference between average membrane potential and highest membrane potential reached during isoelectric period corresponding to AD plateau. Maximum value of AD rising slope (Max. AD slope) was measured as the peak value of the signal's derivative after smoothing with a 1 s time window. Amplitude of DC potential shift (DC shift) was measured at the first negative peak following cessation of artificial ventilation. Maximum value of DC shift falling slope (Max. DC slope) was measured as the peak value of the signal's derivative after smoothing with a 1 s time window.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using MATLAB. Differences between groups were assessed using Wilcoxon ranked sum tests, Wilcoxon signed rank tests, one-way ANOVA or two-way ANOVA when appropriate. Correlations were evaluated by means of Pearson's R^2 values, Spearman's rho values and their level of significance. The sequential rejective Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct multiple comparisons (Benjamini and Hochberg, 1995). Results are represented as mean \pm SD and $P < 0.05$ was considered a significant effect.

Segmentation and analysis of NeuN-positive cells in rat histological slices

A custom Python-based algorithm was developed to segment and quantify NeuN-positive cells in histological slices. The images were first preprocessed to generate a binary mask of the NeuN-positive cells. Briefly, images were blurred using a kernel of 5px neighborhood to reduce high-frequency noise. They were then thresholded using an adaptive gaussian filter (block size of 11px) and a closing morphological filter was applied (5px neighborhood) to fill the masks of individual cells. In addition, small binarized objects that did not correspond to NeuN-positive cells were removed based on their area size ($100 < x < 300 \text{ px}^2$). Finally, the density of NeuN-positive neurons was quantified and plotted according to the cortical depth in the tissue.

Delineation of cortical layers

Gaussian functions, $g(z) = c_1 + c_2 \exp(-(z-z_0)^2/2\sigma^2)$ were fitted to the peaks of the NeuN-positive neurons density profile to delineate L2/3 from L4, L6 from L5. Layer borders Z_{lim} were then defined as the depth $Z_{lim} = z_0 + \sigma \sqrt{2 \ln 2}$. Limit of L1 to L2/3 layers was considered as the sudden jump in positive slope of the NeuN-positive neurons density profile.

Neuron staining and electrode localizing

Recorded neurons were labelled by intracellular injection of neurobiotin (1.5% added to the pipette solution; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). At the end of the experiment, rats were euthanased with euthasol and perfused with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, France) in 0.1 M phosphate-buffered saline solution (PBS; pH 7.4). Brains were post-fixed into 4% paraformaldehyde overnight. After cryoprotection with 30% sucrose, brains were frozen in isopentane ($-50 \pm 5^\circ\text{C}$; Sigma-Aldrich). 50- μm -thick sections were cut on a freezing microtome (Microm HM450, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and incubated overnight in PBS–0.4 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) + 0.4% of each reagent from Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) to create an avidin-biotin complex on labelled neurons. After three washes in PBS, brain sections were pre-incubated 10 min in 0.5 mg/mL diaminobenzidine (DAB dissolved in PBS; Sigma-Aldrich) and 0.02% nickel sulfate (Sigma-Aldrich). Hydrogen peroxide at 0.04% (30% aqueous solution; Merck Millipore, Molsheim, France) was subsequently added for 15 min to stain labelled neurons. Finally, sections were washed four times in PBS, mounted on slides and air dried. Counterstaining was accomplished with safranin (RAL Diagnostics, Martillac, France). Slides were dehydrated in ethanol baths and coverslipped in Eukitt (Sigma-Aldrich). Microphotographs of labelled neurons were taken with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope coupled to a Leica DFC 310 FX camera (Leica Application Suite software) and neuronal reconstruction was performed using PaintNet software.

Before the recording session, silicone probes were coated with a fluorescent dye (DiI, Thermo-Fischer, 1/1000 dilution). After brain extraction, 50 μm thick slices are cut with a cryostat (Leica CM3050S, Leica Microsystems). Slices are then counter-colored with DAPI 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thermo-Fischer) away for light sources, washed twice and then mounted with fluoromount (Sigma-Aldrich). After a drying period in total darkness, slices are observed and scanned using 105 nm (DAPI) and 555 nm (DiI) of a Nanozoomer scanner (Hamamatsu).

Results

Physiological parameters and ECoG activity during anoxia

Control periods displayed low-amplitude, fast ECoG activities (Fig 2b) similar to those recorded in awake periods (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Mahon et coll., 2001). Once artificial ventilation was stopped (Vent. Off) (Fig 1a), EtCO₂ plummeted while SpO₂ begin a

progressive declined toward undetectable values followed by a sharp heart rate (HR) decrease (Fig 1b). ECoG signal amplitude maintains its control values before declining below the isoelectric threshold (see Methods) 55.3 ± 23.3 s after Vent. Off (Fig 1c). WAD emerges on the ECoG signal after 70.4 ± 20.6 s of electro-cerebral silence, at this point HR is at its lowest level (Control: 488 ± 37 bpm; WAD: 165 ± 46 bpm; $p < 0.001$; Fig 1c). Restoration of artificial ventilation (Vent. On), 2 – 3 min after Vent. Off, triggers the near-instant increase in EtCO₂ and leads to the appearance of WpAR after 17.7 ± 7.2 s of isoelectric ECoG (in 61% of all trials), heralding neurophysiological recovery of cortical neurons and networks (Fig 1b, c). In all trials exhibiting WpAR, ECoG amplitude and HR recovered their control values 284.4 ± 186 s after Vent. On (Fig 1b, c) although blood re-oxygenation appeared complete only 1h after Vent. On (Control: 88 ± 7 %; Vent. On +1h: 85 ± 4 %; $p = 0.55$; Fig 1c).

Post-anoxic changes in LFP and intracellular activity

To analyze the changes in cortical spontaneous activity brought about by global brain anoxia, we recorded simultaneously all cortical layers of S1 (Fig 2a) and performed Fourier transforms between Vent. Off and the onset of the isoelectric period (see Methods). This approach allowed us to identify 3 frequency bands dominating the post-anoxia background activity: delta (1 – 5 Hz), theta (6 – 10 Hz) and beta medium gamma (15 – 40 Hz) (Fig 2b; data not shown). By measuring their temporal dynamics, we showed that each frequency band reach their maximum power in sequential fashion, simultaneously in all cortical layers (Fig 2c; ANOVA: timing by layer $p = 0.058$). Around 36 ± 35 s after Vent. Off, LFP activity exhibits its maximum power for beta medium gamma frequencies then progressively slows down toward theta (39 ± 14 s) then delta (44 ± 13 s) frequencies before entering the isoelectric period 65 ± 28 s after Vent. Off (Fig 2c; ANOVA: timing by frequency band $p < 0.001$). Although these changes in LFP frequency content happened simultaneously in all cortical layers, the relative amplitude of oscillations contained in each frequency band is not homogenous (Fig 2a, b). In particular, when LFP activity was dominated by delta band frequencies, their maximum relative power was reached in deep layers of S1 (Power L 2/3: 250 ± 228 % of baseline vs. Power L5: 320 ± 290 % of baseline; $p < 0.05$; Fig 2d). These results were further corroborated by current source density analysis showing current sinks situated in L5 during negative deflections of delta oscillations (data not shown).

In deep layers cortical neurons, these successive changes in synaptic background activity were reflected by changes in membrane properties as well as rate and regularity of firing activity.

Measures of average membrane potential (Vm), firing rate (FR) and regularity (CV2) before (1) and 10s after Vent Off (2) as well as during beta medium gamma (3) and delta (4) surges granted the following results: a short period devoid of significant changes (Vm₁: -68 ± 9 mV vs. Vm₂: -67 ± 6 mV; FR₁: 9.1 ± 5.6 Hz vs. FR₂: 8.5 ± 5 Hz; CV₂₁: 0.93 ± 0.05 vs. CV₂₂: 1.1 ± 0.3; p > 0.05; n= 5; Fig 2e) precedes a period of slightly depolarized Vm (Vm₃: -65 ± 5 mV; p < 0.05; n=5), a 40 % increase in FR (FR₃: 17.6 ± 18 Hz; n=4) and decreased CV2 (CV₂₃: 0.8 ± 0.3; n=4) lasting for 12 ± 4 s (Fig 2e). After this period of increased activity, while the LFP is dominated by delta range oscillations Vm, FR and firing regularity suddenly decreased (Vm₄: -70 ± 8 mV; FR₄: 4.8 ± 2 Hz; CV₂₄: 1.1 ± 0.3; n=4) in deep layer cortical neurons (Fig 2e) before entering electro-cerebral silence leading to WAD.

Initiation and propagation of WAD in S1

The simultaneous monitoring of LFP activity in all cortical layers allowed us to record the initiation of the WAD and its subsequent propagation in S1 (Fig 3a). In our experiments the WAD was initiated in deep cortical layers, for 66% of trials (n= 16 trials) the WAD initiated in layer 5 (1063 ± 163 µm bellow surface; L5) and for the remaining 33% of trials (n= 8 trials), WAD initiated in layer 6 (1520 ± 144 µm bellow surface; L6) (Fig 3b). Regardless of their initiation site WADs first appear on LFP signals at similar delays (L5: 134 ± 28 s vs. L6: 139 ± 27 s after Vent. Off; p= 0.97) and propagated bidirectionally at similar speed (Up. Speed, L5: 19 ± 17 mm/min vs. L6: 14 ± 9 mm/min; p= 0.47; Down. Speed, L5: 13 ± 10 mm/min vs. L6: 33 ± 19 mm/min; p= 0.14; Fig 3 c, d). We then performed the analysis of the morphological parameters of initiating WAD of both sites i.e., the negative peak amplitude, its slope and the WAD half-width to assess the synchronization level of cortical networks in the initiation site's vicinity. For both sites measures of peak amplitude (L5: 2.6 ± 1 mV vs. L6: 3.1 ± 0.8 mV; p= 0.3), negative slope (L5: 1.2 ± 0.8 mV/s vs. L6: 1.8 ± 0.7 mV/s; p= 0.1) granted similar values, WAD half-width was however shorter in L6 (L5: 3.2 ± 0.4 s vs. L6: 2.8 ± 0.1 s; p < 0.05) (Fig 3 c, d). Altogether these results suggest that similar WADs initiate preferentially in L5 or L6 and subsequently travel to both ventrodorsal ends of S1 at similar speed, regardless of their initiation site.

Corresponding WpAR in S1

The restoration of artificial ventilation brought about the appearance of WpAR in all cortical layers after 17.6 ± 7 s (Fig 3e, f). No correspondence between initiation sites of WAD and

WpAR were observed as WpAR origin depths were unimodally distributed and did not correlate with the preceding WAD origin depth (Spearman's rho: -0.07; $p= 0.74$; Fig 3f, h). In contrast with the preceding WAD, WpAR appearance in neighboring cortical layer did not seem to rely on propagation mechanisms as the data could not be fitted using parabolic functions ($p > 0.05$; Fig 3g).

Intracellular and DC correlates of propagating WAD

Anoxic depolarization (AD) is characterized by an extracellular DC shift simultaneously occurring with a near-total depolarization of neurons (Hansen, 1985; Pietrobon and Moskowitz, 2014). To ascertain that all the WADs recorded in the cortical LFP were full-fledged ADs we performed paired extracellular DC potential (Fig. 4a, b) and intracellular recordings (Fig. 4a, c) of the most frequent WAD initiation layer (L5; DC: $1075 \pm 234 \mu\text{m}$; Intra.: $1311 \pm 186 \mu\text{m}$) as well as a non-initiating layer (L 2/3; DC: $308 \pm 109 \mu\text{m}$; Intra.: $632 \pm 201 \mu\text{m}$).

In both recorded sites, 1.6 to 3.3 of brain anoxia led to negative DC shifts of similar amplitude (L 2/3: $18.2 \pm 5.1 \text{ mV}$ vs. L 5: $21.4 \pm 6 \text{ mV}$; $n= 12$; $p= 0.35$; Fig 4d). The DC shifts reached their maximum values with a $7.3 \pm 4 \text{ s}$ delay between recording sites which corresponds to a $8.3 \pm 4.6 \text{ mm/min}$ propagation speed between recording sites, similar results were obtained with high-pass filtered signals (see Methods; delay: $4.5 \pm 2.6 \text{ s}$; speed: 14.3 ± 9.2 ; Fig 4b). Measures of maximum negative slopes granted greater values for superficial DC shifts, although when compared to deeper ones, the difference did not reach statistical significance (L 2/3: $29.1 \pm 15 \text{ mV/s}$ vs. L 5: $17.7 \pm 10.3 \text{ mV/s}$; $n= 12$; $p= 0.37$; Fig 4d). We recorded a total of 18 S1 neurons *in vivo*. Subsequent histological analysis revealed the position of labelled cells in cortical layers 5 ($n= 10$) and 2/3 ($n= 8$) and the morphological characteristics of pyramidal cells. During normoxic periods, active cells recorded from L5 ($n= 8$) had a faster firing activity than L 2/3 cells ($n= 6$) despite a high cell to cell variability (L5: $5.6 \pm 5.5 \text{ Hz}$ vs. L 2/3: $0.46 \pm 0.47 \text{ Hz}$; $p < 0.05$).

Local inhibition of Na/K ATPases activity

To elicit an Na/K ATPases blockade in cortical neurons, we performed local injection of ouabain (50 – 100 nL, 1 – 5 mM) in S1 most frequent WAD initiation layer (L5; $1012 \pm 88 \mu\text{m}$; $n= 6$) as well as a non-initiating layer (L2/3; $322 \pm 32 \mu\text{m}$; $n= 6$) while recording cortical LFP activity. Ouabain injection led to the appearance of a WAD-like triphasic wave after $32.6 \pm 23.2 \text{ s}$ (L2/3: $29 \pm 17.2 \text{ s}$ vs. L5: 36.2 ± 29.2 ; $p= 0.9$; Fig 5a, e). This WAD-like wave originated

from the injection site (Inj. Depth vs. WAD origin: $R^2 = 0.8$; $p < 0.001$; Fig 5a, d) and propagated downward at similar speed from both initiation sites (L2/3: 7.2 ± 5.4 mm/min vs L5: 10.8 ± 9 mm/min; $p = 0.81$; Fig 1b, c, e). Upward propagation was only observable in L5 injections (20.4 ± 17.4 mm/min; $n = 3$). The initiating waves shared similar amplitude (L2/3: 1.7 ± 1.3 mV vs. L5: 2.1 ± 1 mV; $p = 0.8$), maximal negative slope (L2/3: 1.3 ± 1.4 mV/s vs. L5: 1.1 ± 0.8 mV/s; $p = 0.9$) and half-width (L2/3: 4.7 ± 2 s vs L5: 4 ± 2 s; $p = 0.4$) suggesting neuronal subpopulations neighboring the injections underwent similar depolarizations (Fig 5c, e). Apart from initiation delay, for all the measured parameters, values obtained by ouabain injections were statistically similar to those obtained by natural brain anoxia (data not shown). Altogether these results suggest that the stopping of Na/K ATPases in a subset of S1 cortical neurons can lead to a global depolarization of S1 cortical column.

Discussion

In our new *in vivo* model, we described, by a multi-scale approach, the neuronal and network processes of induction and early recovery from global anoxia in S1. Firstly, Vent. Off lead to the cortex-wide maintaining of beta-gamma LFP activity reflected by a higher firing frequency in the underlying pyramidal cells. Then, the cortical LFP is overwhelmed by delta oscillations predominating in the deep layers of S1 before entering an anoxic isoelectric state. After 1 to 2 min of continuous isoelectric state, the WAD is initiated in L5 or L6 and engage in a kinetically uniform bidirectional propagation. We showed that cortical neurons and local DC potentials of both L5 and L2/3 display ADs and large negative DC shifts respectively during our protocol suggesting that all the WADs recorded in the LFP correspond to genuine ADs in the underlying neuronal populations. We corroborated this hypothesis by showing that the local blockade of Na/K ATPases in both L2/3 and L5 by ouabain triggers WAD-like waves near the injection site which then propagate to the rest of the cortical column. Finally, Vent. On brought about in 80% of trials the cancellation of preceding DC shift reflected in the LFP by WpAR initiated in L5 regardless of the initiation depth of the preceding WAD. WpAR systematically heralded the recovery of the spontaneous ECoG and LFP activity along with the progressive recovery of HR and SpO2 values, reaching their control values back after 1h.

Our asphyxia protocol led to a rapid bump of beta-medium-gamma LFP activities. These results are less unequivocal than those reported in our previous study (Schramm et coll., 2020) or gamma activities surges observed in terminal anoxia models (Borjigin et coll., 2013; Vanderwolf et coll., 1988). This discrepancy may be rooted in the different pharmacological

control condition since fentanyl sedation is characterized by awake-like ECoG composed of oscillations in the beta-gamma range (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Bruno and Sakmann, 2006; Mahon et coll., 2001) whereas, in our previous study, animals were under barbiturates anesthesia characterized by large ECoG oscillations similar to sleep spindle thus deprived of fast ECoG activities, (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Contreras et coll., 1997; Destexhe et coll., 2003; Steriade et coll., 1993a) thus amplifying the beta-medium-gamma bump we observed. Terminal anoxia is induced by KCl intracardiac injections (Borjigin et coll., 2013) or decapitation (van Rijn et coll., 2011; Vanderwolf et coll., 1988) leading to a total and abrupt stop of brain perfusion and potentially faster anoxia-induced release of glutamate and increase therefore intracellular calcium concentration (Binshtok et coll., 2006; Katchman and Hershkowitz, 1993; Revah et coll., 2016). Although relatively different, the reproducibility of early anoxia-induced synaptic events across models and experimental set-ups (Allen and Attwell, 2004; Borjigin et coll., 2013; Madl and Royer, 2000; Schramm et coll., 2020; Vanderwolf et coll., 1988) indicates that the beta-medium-gamma and delta frequencies bumps constitute reliable biomarkers of brain anoxia.

We showed that WAD is initiated preferentially in L5 and L6. This differential susceptibility to anoxia may be explained by the high metabolic demand of deep layers cortical neurons. In our study, L5 neurons had more depolarized membrane potential and higher firing activity than L2/3 neurons. L5 significant amount of cortico-cortical and thalamo-cortical excitatory inputs (Constantinople and Bruno, 2013c; Feldmeyer, 2012; Feldmeyer et coll., 2013; Markram et coll., 1997; Petersen, 2007) apply an intense synaptic barrage that could explain the high firing frequencies of L5 neurons in our preparation. As processes of synaptic integration and AP generation constitute 81% of neuronal energy budget (Ames, 2000; Attwell and Laughlin, 2001) and Na/K ATPases activity is positively correlated with firing activity (Kaplan, 2002; Wang and Huang, 2006), the higher neuronal activity of deep layer neurons before Vent. Off may be associated with a higher ATP consumption rendering deep cortical layers more sensitive to oxygen deprivation. Experimental hindering of deep layers neurons' activity by optogenetics or pharmacological inhibition (Bitzenhofer et coll., 2017; Xie et coll., 1995) should influence the initiation of cortical WAD during global anoxia.

References

- Aitken, P.G., Tombaugh, G.C., Turner, D.A., and Somjen, G.G. (1998). Similar propagation of SD and hypoxic SD-like depolarization in rat hippocampus recorded optically and electrically. *J. Neurophysiol.* *80*, 1514–1521.
- Allen, N.J., and Attwell, D. (2004). The effect of simulated ischaemia on spontaneous GABA release in area CA1 of the juvenile rat hippocampus. *J. Physiol.* *561*, 485–498.
- Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Mahon, S., and Charpier, S. (2014). Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J. Physiol.* *592*, 3577–3595.
- Altwegg-Boussac, T., Schramm, A.E., Ballesterro, J., Grosselin, F., Chavez, M., Lecas, S., Baulac, M., Naccache, L., Demeret, S., Navarro, V., et coll. (2017). Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain* *140*, 2381–2398.
- Ames, A. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* *34*, 42–68.
- Andrew, R.D., Hsieh, Y.T., and Brisson, C.D. (2017). Spreading depolarization triggered by elevated potassium is weak or absent in the rodent lower brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *37*, 1735–1747.
- 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.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* *57*, 289–300.
- Binshtok, A.M., Fleidervish, I.A., Sprengel, R., and Gutnick, M.J. (2006). NMDA receptors in layer 4 spiny stellate cells of the mouse barrel cortex contain the NR2C subunit. *J. Neurosci.* *26*, 708–715.
- Bitzenhofer, S.H., Ahlbeck, J., Wolff, A., Wiegert, J.S., Gee, C.E., Oertner, T.G., and Hanganu-Opatz, I.L. (2017). Layer-specific optogenetic activation of pyramidal neurons causes beta-gamma entrainment of neonatal networks. *Nat. Commun.* *8*.
- Bogdanov, V.B., Middleton, N.A., Theriot, J.J., Parker, P.D., Abdullah, O.M., Ju, Y.S., Hartings, J.A., and Brennan, K.C. (2016). Susceptibility of Primary Sensory Cortex to

Spreading Depolarizations. *J. Neurosci.* *36*, 4733–4743.

Borjigin, J., Lee, U., Liu, T., Pal, D., Huff, S., Klarr, D., Sloboda, J., Hernandez, J., Wang, M.M., and Mashour, G.A. (2013). Surge of neurophysiological coherence and connectivity in the dying brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14432–14437.

Brisson, C.D., and Andrew, R.D. (2012). A neuronal population in hypothalamus that dramatically resists acute ischemic injury compared to neocortex. *J. Neurophysiol.* *108*, 419–430.

Brisson, C.D., Lukewich, M.K., and Andrew, R.D. (2013). A distinct boundary between the higher brain's susceptibility to ischemia and the lower brain's resistance. *PLoS One* *8*, 1–14.

Bruno, R.M., and Sakmann, B. (2006). Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* (80-.). *312*, 1622–1627.

Clute, H.L., and Levy, W.J. (1990). Electroencephalic changes during brief cardiac arrest in humans. *Anesthesiology* *73*, 821–825.

Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2013). Deep Cortical Layers Are Activated Directly by Thalamus (Supplementary Materials). *Science* (80-.). *340*, 1591–1594.

Contreras, D., Destexhe, A., Sejnowski, T.J., and Steriade, M. (1997). Spatiotemporal patterns of spindle oscillations in cortex and thalamus. *J. Neurosci.* *17*, 1179–1196.

Cunningham, M.O., Pervouchine, D.D., Racca, C., Kopell, N.J., Davies, C.H., Jones, R.S.G., Traub, R.D., and Whittington, M.A. (2006). Neuronal metabolism governs cortical network response state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5597–5601.

Destexhe, A., Rudolph, M., and Paré, D. (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 739–751.

Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front. Neuroanat.* *6*, 1–22.

Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C.C.H., Poulet, J.F.A., Staiger, J.F., Luhmann, H.J., and Schwarz, C. (2013). Barrel cortex function. *Prog. Neurobiol.* *103*, 3–27.

Hansen, A.J. (1978). The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol. Scand.* *102*, 324–329.

Hansen, A.J. (1985). Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* *65*, 101–

148.

Hossmann, K.A., and Kleihues, P. (1973). Reversibility of Ischemic Brain Damage. *Arch. Neurol.* *29*, 375–384.

Juzekaeva, E., Nasretidinov, A., Gainutdinov, A., Sintsov, M., Mukhtarov, M., and Khazipov, R. (2017). Preferential initiation and spread of anoxic depolarization in layer 4 of rat barrel cortex. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 1–11.

Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 511–535.

Katchman, A.N., and Hershkowitz, N. (1993). Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.* *70*, 1–7.

Kaufmann, D., Theriot, J.J., Zyuzin, J., Service, C.A., Chang, J.C., Tang, Y.T., Bogdanov, V.B., Multon, S., Schoenen, J., Ju, Y.S., et coll. (2017). Heterogeneous incidence and propagation of spreading depolarizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *37*, 1748–1762.

Kawai, K., Nitecka, L., Ruetzler, C.A., Nagashima, G., Joo, F., Mies, G., Nowak, T.S., Saito, N., Lohr, J.M., and Klatzo, I. (1992). Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *12*, 238–249.

Lee, D.E., Lee, L.G., Siu, D., Bazrafkan, A.K., Farahabadi, M.H., Dinh, T.J., Orellana, J., Xiong, W., Lopour, B.A., and Akbari, Y. (2017). Neural Correlates of Consciousness at Near-Electrocerebral Silence in an Asphyxial Cardiac Arrest Model. *Brain Connect.* *7*, 172–181.

Lipton, P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Rev.* *79*, 1431–1568.

Madl, J.E., and Royer, S.M. (2000). Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxic and hypoglycemic rat hippocampal slices. *Neuroscience* *96*, 657–664.

Mahon, S., Deniau, J.-M., and Charpier, S. (2001). Relationship between EEG Potentials and Intracellular Activity of Striatal and Cortico-striatal Neurons: an In Vivo Study under Different Anesthetics. *Cereb. Cortex* *11*, 360–373.

Markram, H., Lu, J., Frotscher, M., and Sakmann, B. (1997). Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. *275*, 1–3.

Nasretidinov, A., Lotfullina, N., Vinokurova, D., Lebedeva, J., Burkhanova, G., Chernova, K., Zakharov, A., and Khazipov, R. (2017). Direct current coupled recordings of cortical

- spreading depression using silicone probes. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 1–11.
- Oostenveld, R., Fries, P., Maris, E., and Schoffelen, J.M. (2011). FieldTrip: Open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput. Intell. Neurosci.* *2011*.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in STereotaxic Coordinates* 6th Edition (Academic Press).
- Petersen, C.C.H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* *56*, 339–355.
- Pietrobon, D., and Moskowitz, M.A. (2014). Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 379–393.
- Revah, O., Lasser-Katz, E., Fleidervish, I.A., and Gutnick, M.J. (2016). The earliest neuronal responses to hypoxia in the neocortical circuit are glutamate-dependent. *Neurobiol. Dis.* *95*, 158–167.
- van Rijn, C.M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S., and Coenen, A.M.L. (2011). Decapitation in rats: Latency to unconsciousness and the “wave of death.” *PLoS One* *6*, 1–6.
- Schramm, A.E., Carton-Leclercq, A., Diallo, S., Navarro, V., Chavez, M., Mahon, S., and Charpier, S. (2020). Identifying neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia. *Prog. Neurobiol.* *185*, 101733.
- Steriade, M. (2004). Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 121–134.
- Steriade, M., Dossi, R.C., and Contreras, D. (1993). Electrophysiological properties of intralaminar thalamocortical cells discharging rhythmic (≈ 40 HZ) spike-bursts at ≈ 1000 HZ during waking and rapid eye movement sleep. *Neuroscience* *56*, 1–9.
- Vanderwolf, C.H., Buzsaki, G., Cain, D.P., Cooley, R.K., and Robertson, B. (1988). Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res.* *451*, 340–344.
- Wang, Y.C., and Huang, R.C. (2006). Effects of sodium pump activity on spontaneous firing in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* *96*, 109–118.
- Xie, Y., Zacharias, E., Hoff, P., and Tegtmeier, F. (1995). Ion channel involvement in anoxic

Figures

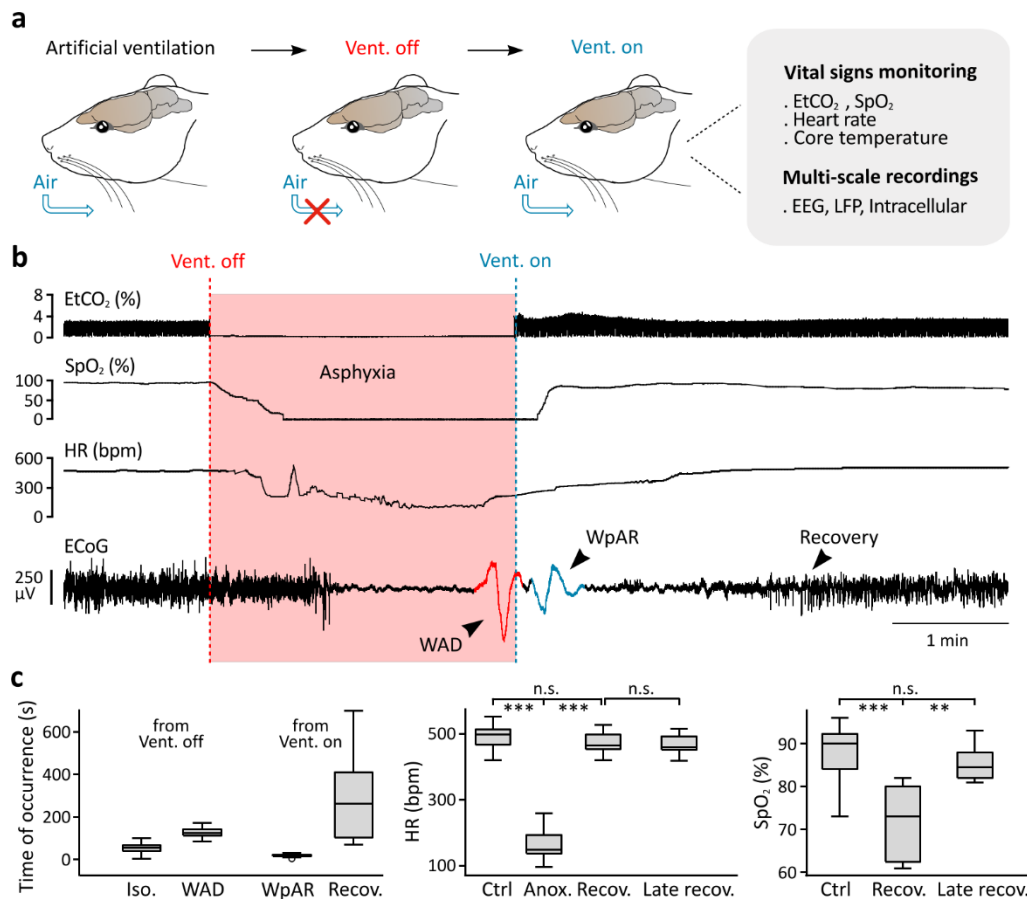


Fig 1: Monitoring of anoxia and resuscitation processes. **A/** Schematic representation of experimental set-up **B/** Monitoring of end-tidal CO₂ (EtCO₂; top), peripheral oxygen saturation (SpO₂; top center), heart rate (HR; bottom center) along with ECoG recording of primary somatosensory cortex (bottom) during the experimental trial, dashed line represent cessation (Vent. Off; red) and reinstating (Vent. On; blue) of artificial ventilation respectively, arrows show WAD negative peak (upward arrow) and WpAR positive peak (downward arrow) respectively. **C/** Box plots displaying population data for noticeable ECoG events delays (left) HR (center) and SpO₂ levels (right) (Wilcoxon’s signed rank test, *** = p<0.001). For these boxplots and in all following figures, upper and lower edges of boxes represent 75th and 25th percentiles respectively, middle lines represent the median value and whiskers represent the extreme values.

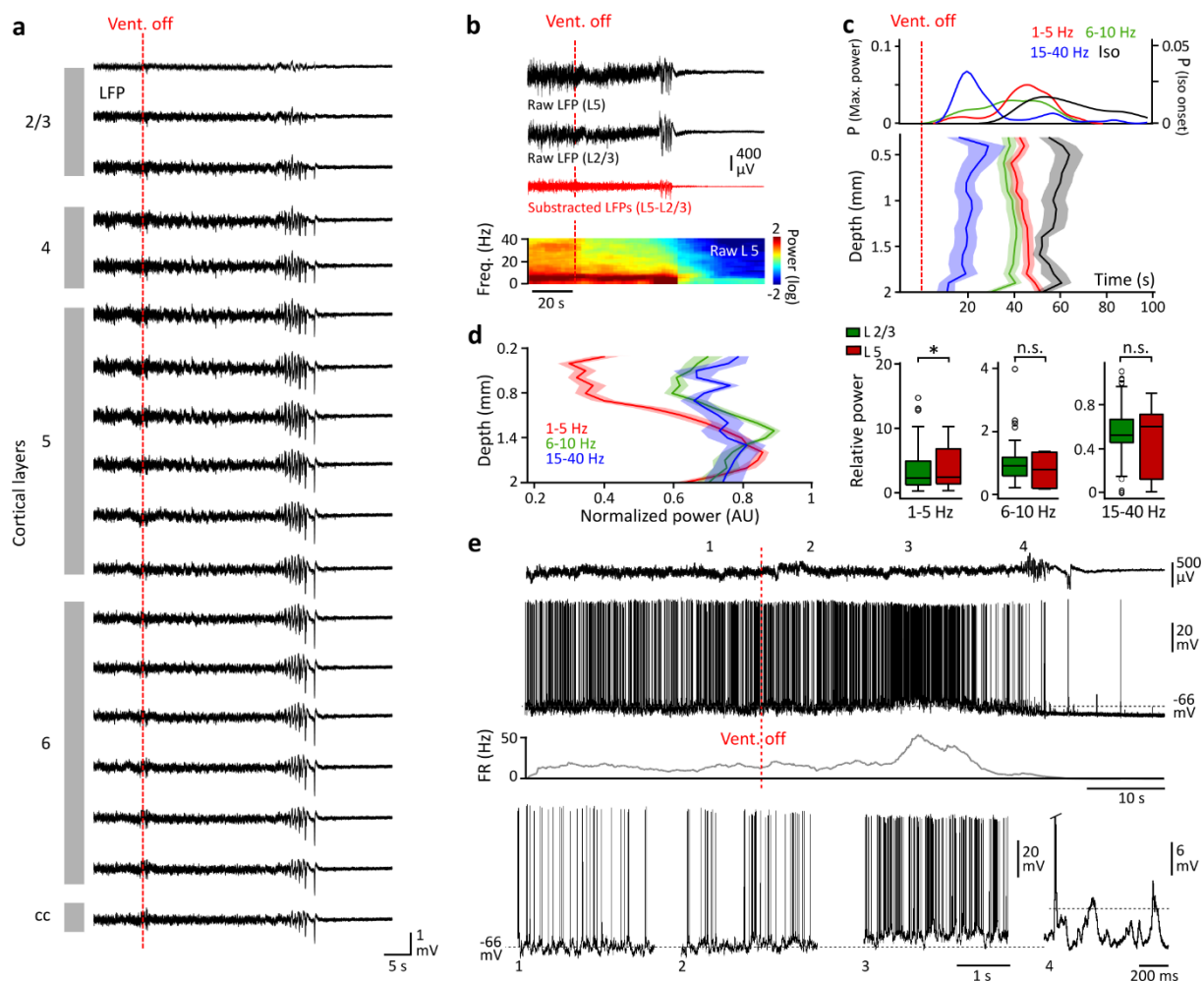


Fig 2: Post-Vent. Off modifications of cortical LFP and intracellular activity. **A/** Recording of cortical LFP activity following Vent. Off at different depths of hind limb S1 with 32 channel silicone probe (100 μm spacing between recording sites). **B/** LFP recordings of cortical L2/3 (top trace) and L5 (center trace) along with the resulting subtraction of signals (bottom trace). The bottom time-frequency map of L5 LFP signal is normalized by decimal logarithm. **C/** top panel: kernel smoothing fitted distribution of max power timings for 1 – 5 Hz (red), 6 – 10 Hz (green) and 15 – 40 Hz (blue) frequency bands coupled with distribution of isoelectric LFP onset timings (black) from all cortical recording sites. Bottom panel: Average distribution of max power timings for for 1 – 5 Hz (red), 6 – 10 Hz (green) and 15 – 40 Hz (blue) frequency bands with average isoelectric LFP onset timings (black) according to cortical depth (drawn as mean \pm SEM). **D/** Average distribution of max power values relative to baseline, normalized between 0 (minimal values) and 1 (maximum values), according to cortical depth (drawn as mean \pm SEM). **E/** Top trace: intracellular activity of a L5 pyramidal neuron before Vent. Off (1), 10s after Vent. Off (2), during the 15 – 40 Hz highest power period (3) and during the 1- 5 Hz highest power period (4). Middle trace: corresponding firing rate averaged over a 3 s window. Bottom traces: zoomed in intracellular activity during each aforementioned period.

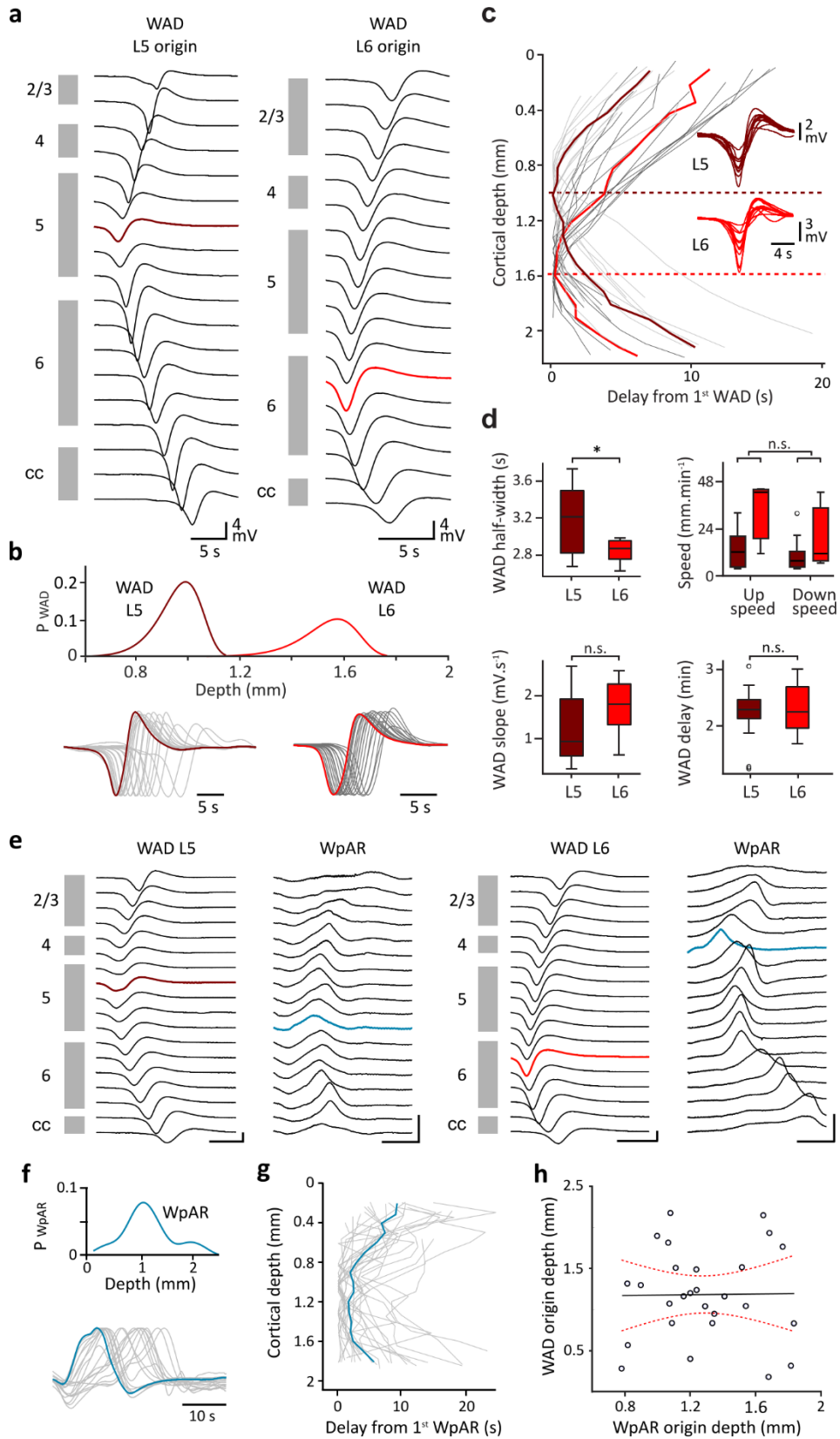


Fig 3: Initiation and propagation of WADs and corresponding WpAR. **A/** Example traces of 32 channel silicone probe recordings along with electrode positioning in regard of histologically established cortical layers. Traces display WAD initiation in S1 L5 (dark red, left) and L6 (light red, right). **B/** Top: relative fitted distribution (Weibull distribution) of initiating electrode depths in S1. Bottom: normalized LFP traces showing time course of WADs originating from each site. **C/** Bidirectional propagation average profiles for WADs, individual trials are displayed in light grey (L5) or dark grey (L6) while medians are displayed in bold dark red (L5) or light red (L6), dashed lines represent average initiation depths for both sites. Inset: overdraw of WADs recorded at initiation sites in L5 (top, dark red) and L6 (bottom, light red) (n= 16 and 8 respectively). **D/** Boxplots showing population data comparisons for half-width (top left), propagation speeds for both upward (Up speed) and downward (Down speed) propagation (top right), maximum falling slope (bottom left) and earliest WADs delays from Vent. Off (bottom right). Propagation speed comparisons are made between directions in the same group (Wilcoxon signed rank test, $*=p<0.05$) and for same the same direction across groups (Wilcoxon ranked sum test, $*=p<0.05$) while all remaining data was compared between groups (Wilcoxon ranked sum test, $*=p<0.05$). **E/** Left: LFP recording of L5 originating WAD (left panel) followed by WpAR of deeper origin (blue trace). Right: LFP recording of WAD originating in L6 (left panel) followed by WpAR originating in more superficial cortical layer (blue trace). **F/** Top: kernel smoothing fitted relative distribution of WpAR origin depths. Bottom: normalized LFP traces showing time course of WpAR (full trial not shown here). **G/** Bidirectional propagation profile of WpARs, individual trials are displayed in light grey while median profile is displayed in blue bold trace. **H/** Scatter plot displaying the origin depth of WADs vs. the origin depth of the corresponding WpAR. The black full line represent the linear fit of data while red dashed lines represent 95% confidence interval (Spearman's $\rho = -0.07$; $p=0.74$).

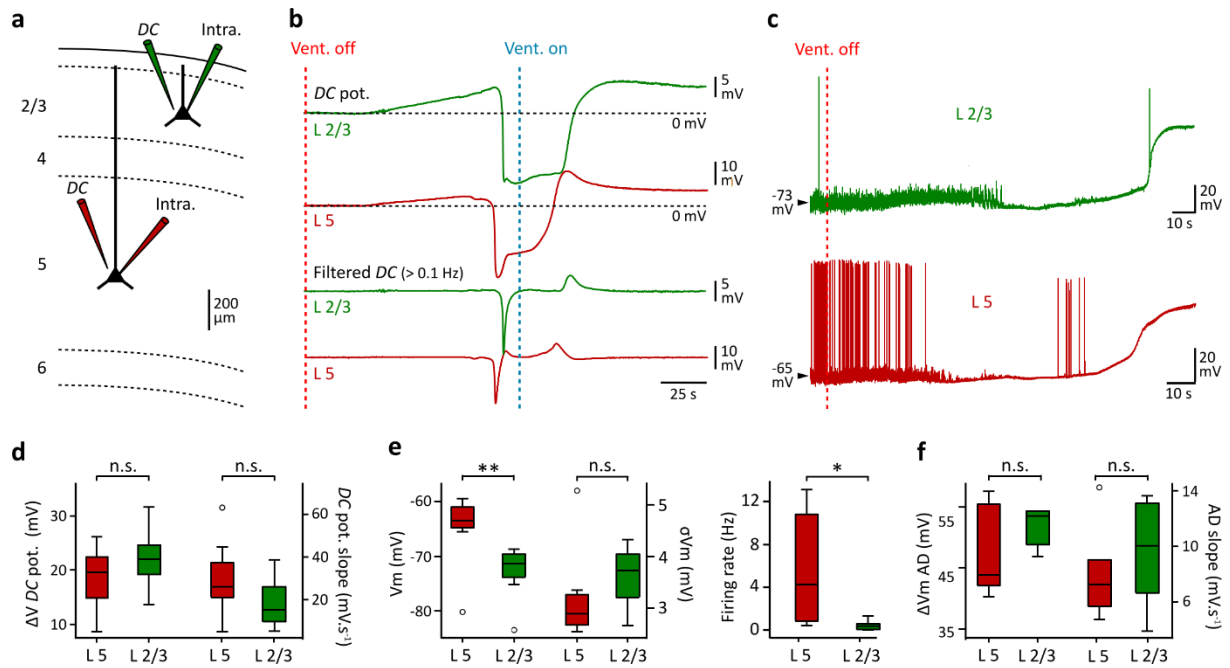


Fig. 4: Neuronal correlates of WAD and WpAR. **A/** Schematic representation of recordings performed in layer 2/3 (green) and 5 (red) of the primary somatosensory cortex. **B/** Top traces: Simultaneous DC potential recordings of layer 2/3 and 5 of primary somatosensory cortex during cessation (Vent. Off dashed red line) and subsequent reinstating (Vent. On dashed blue line) of artificial ventilation. Bottom traces: Same recordings as in top panel high-pass filtered (0.1 Hz) using amplifier filter. **C/** Intracellular recording of pyramidal neurons in layer 2/3 and 5 of primary somatosensory cortex during cessation (Vent. Off dashed red line) of artificial ventilation. **D/** Boxplots displaying comparisons between layers of pooled data for DC shift amplitude (left) and maximum value of DC falling slope (right) (Wilcoxon's signed rank test). **E/** Boxplots and bar plot showing comparisons between layers of neurons' membrane potential (V_m , left) and average V_m fluctuations (σV_m , left) (Wilcoxon's ranked sum test $**=p<0.01$). **F/** Boxplots displaying comparisons between layers of pooled data for firing rate (left), AD amplitude and maximum value of AD rising slope (right) (Wilcoxon's ranked sum test $*=p<0.05$).

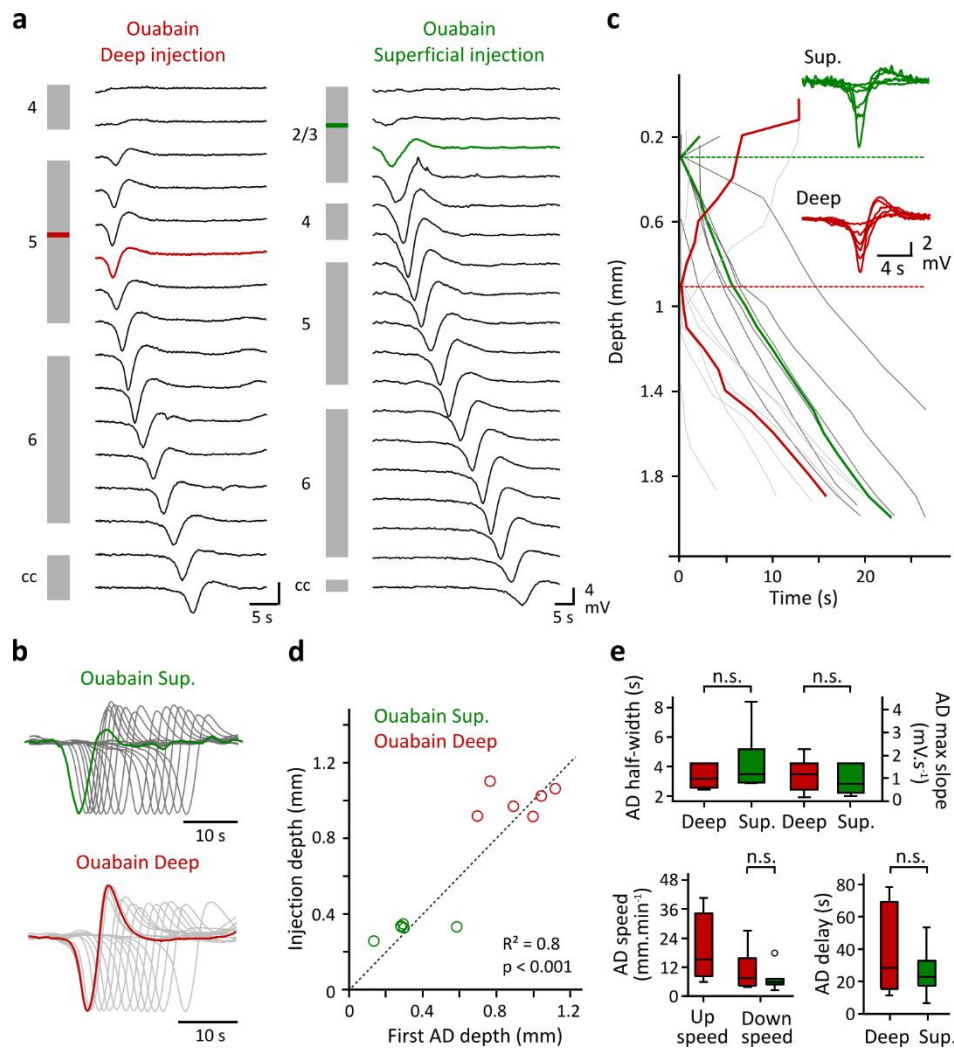


Fig. 5: Local blockade of Na/K ATPases by ouabain injections. **A/** Example traces of 32 channel silicone probe recordings along with electrode positioning in regard of histologically established cortical layers, lines indicate injection depth for L5 (red) and L2/3 (green). Traces display WAD-like wave initiation in S1 L5 (red, left) and L2/3 (green, right). **B/** Normalized LFP traces showing time course of WAD-like waves originating from each layer. **C/** Bidirectional propagation average profiles for WAD-like waves, individual trials are displayed in light grey (L5) or dark grey (L2/3) while medians are displayed in bold red (L5) or green (L2/3), dashed lines represent average initiation depths for both sites. Inset: overdraw of WAD-like waves recorded at initiation sites in L2/3 (top, green) and L5 (bottom, red) ($n = 6$ for both sites). **D/** Scatter plot displaying the depths of injections vs. the corresponding WAD-like wave origin depth, the black dashed line indicates the $x = y$ function (linear fit of data $R^2 = 0.8$, $p < 0.001$). **E/** Boxplots displaying pooled data for initiating WAD-like wave's half-width (top left), maximum falling slope (top right), upward and downward propagation speeds (bottom left) and delay from injection (bottom right) (Wilcoxon's ranked sum test).

3 Discussion

3.1 Avant-propos

L'établissement de plusieurs modèles de cerveau isoélectrique pharmacologique et anoxique a permis une meilleure compréhension de cet état cérébral extrême. Nous avons pu suivre l'évolution au cours du temps, et en temps réel, des différents paramètres de l'excitabilité corticale, de l'intérieur du neurone à l'EEG de surface. Cette approche expérimentale nous a permis de proposer une classification des états isoélectriques sur des bases neurophysiologiques, contrastant avec une vision essentialiste du cerveau silencieux basée sur l'évaluation clinique des patients et les aspects qualitatifs du tracé EEG.

3.2 Les états isoélectriques pharmacologiques

Afin d'étudier les fonctions neuronales potentiellement persistantes durant l'état isoélectrique cérébral, nous avons développé un nouveau modèle *in vivo* chez le rat dans lequel la suppression des activités endogènes du cerveau était induite, puis inversée par un ajustement des concentrations d'isoflurane. Dans la condition isoélectrique, les neurones des couches profondes du cortex somatosensoriel primaire étaient plus hyperpolarisés mais leur résistance membranaire restait inchangée. Tous les neurones enregistrés conservaient la capacité de répondre par des décharges de PAs à des stimulations directes par injections intracellulaires de courant, toutefois les intensités nécessaires à leur activation étaient plus importantes. Les réponses sensorielles issues de la stimulation des vibrisses étaient quant à elles moins amples et retardées du fait d'une diminution significative de la décharge évoquée dans les neurones thalamo-corticaux correspondants. Ces résultats montrent que les neurones et réseaux conservent leur excitabilité et leur capacité à intégrer des informations périphériques durant le coma pharmacologique profond, confirmant et élargissant les résultats obtenus dans une modèle de coma isoélectrique induit par une surdose de barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2016, 2017).

3.2.1 Induction de l'état isoélectrique par les éthers halogénés

Notre nouvelle étude a démontré qu'une dose élevée d'isoflurane (> 3,5%) interrompait à terme l'activité spontanée dans la voie thalamo-corticale se reflétant dans l'ECoG par un tracé isoélectrique continu similaire à celui enregistré chez l'humain (2,5%), le chat (> 3%) et le chien (> 3% ; Eger et coll., 1971; Ferron et coll., 2009; Kroeger et Amzica, 2007; Newberg et coll., 1983). Le silence électro-cérébral enregistré dans l'ECoG des rats était corrélé à une abolition totale des fluctuations de potentiel membranaire d'origine synaptique dans les neurones corticaux sous-jacents. Comme précisé dans l'introduction (voir chapitre 1.3.3.2), les éthers halogénés sont connus pour leurs effets cellulaires multiples qui, majoritairement, ont une action négative sur l'intégration synaptique et la décharge (Alkire et coll., 2008; Campagna et coll., 2003; Krasowski et Harrison, 1999). Cependant les mécanismes neuronaux et de circuits responsables de la mise au silence du cortex n'étaient pas encore connus. Dans notre préparation, l'état contrôle était caractérisé par un patron ECoG composé d'oscillations lentes (0,5 – 4 Hz) semblables aux activités corticales du sommeil lent (Steriade, 2006; Steriade et coll., 1993d). Ce signal cortical était dépourvu d'activités beta-gamma, ce qui est caractéristique des patrons EEG enregistrés lors d'anesthésies aux éthers halogénés (Aksenov et coll., 2019; Purdon et coll., 2015). Dans les neurones pyramidaux néocorticaux, les valeurs moyennes de potentiel membranaire, ainsi que la fréquence et la régularité de décharge étaient plus basses que celles mesurées dans les mêmes neurones lors de l'éveil ou dans des états cérébraux proche de celui-ci (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Destexhe et coll., 2003). En effet, dans l'état contrôle isoflurane léger), les variations de potentiel membranaire n'atteignaient le seuil de déclenchement des PAs que lors d'amples dépolarisation erratiques causées exclusivement par des entrées synaptiques dépolarisantes synchrones. Cette observation est cohérente avec l'action inhibitrice des éthers halogénés sur la transmission glutamatergique, limitant la libération de glutamate (Baumgart et coll., 2015; Westphalen et coll., 2013; Wu et coll., 2004) et inhibant directement les récepteurs glutamatergiques (Cheng et Kendig, 2000; El-Beheiry et Puil, 1989). Cette atténuation de la dépolarisation d'origine synaptique par l'isoflurane affecte la sommation temporelle faite au sein des dendrites et diminue la probabilité qu'ont les potentiels postsynaptiques dépolarisant d'atteindre le seuil de déclenchement des PAs, faisant des neurones pyramidaux des détecteurs de coïncidences. Dans notre modèle, l'augmentation soudaine des doses d'isoflurane (3,5 – 4 %) entraînait dans un premier temps une déstructuration du patron ECoG, incluant des périodes de suppression de durée croissante

interrompant de lentes dépolarisations oscillatoires, faisant émerger un patron de type B-S. Cette altération progressive de l'activité corticale de fond est caractéristique de l'induction de l'état B-S par les éthers halogénés (Amzica, 2015; Kroeger and Amzica, 2007). Au niveau intracellulaire, comme il a été déjà observé chez le chat *in vivo* (Ferron et coll., 2009; Kroeger and Amzica, 2007; Steriade et coll., 1994), le potentiel membranaire des neurones corticaux présentait une alternance de périodes de silence électrique et d'amples bouffées de dépolarisations pouvant déclencher de PAs. Avec l'allongement croissant des périodes de suppression, l'ECoG devenait isoélectrique environ 6min après l'augmentation des doses d'isoflurane, aucune fluctuation de potentiel membranaire d'origine synaptique n'était alors détectable dans les neurones corticaux et la décharge des neurones thalamo-corticaux était abolie.

Les actions dose-dépendantes de l'isoflurane sur les récepteurs postsynaptiques glutamatergiques, la libération de neurotransmetteurs et l'activité des canaux voltage-dépendants sont très certainement responsables de la suppression de l'activité spontanée dans notre modèle (voir chapitre 1.3.3.3 pour détails ; Alkire et coll., 2008; Brown et coll., 2010; Campagna et coll., 2003; Krasowski et Harrison, 1999; Rudolph et Antkowiak, 2004). L'interruption des activités synaptiques endogènes entraînait un tracé intracellulaire plat associé à un potentiel membranaire moyen hyperpolarisé de ~6 mV similaire à celui mesuré dans le modèle barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017). L'hyperpolarisation des neurones corticaux dans notre modèle était moins importante que celle observée chez le chat plongé dans un état isoélectrique par l'isoflurane (Kroeger and Amzica, 2007) suggérant une action plus marquée de la substance anesthésiante dans cette espèce, peut-être due à une expression différentielle de certains canaux ioniques sensibles à l'isoflurane. La polarisation cellulaire est vraisemblablement une conséquence directe de l'abolition du barrage synaptique dépolarisant amenant le potentiel de membrane vers sa valeur de repos où la somme des courants membranaires devient nulle (Altwegg-Boussac et coll., 2014), phénomène amplifié par la potentialisation des courants potassiques de fuite par l'isoflurane ayant tendance à déplacer le potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre des ions potassium (Patel et coll., 1999).

L'arrêt des activités corticales était concomitant d'un arrêt de la décharge des neurones thalamo-corticaux. Bien que nous n'ayons pas analysé les propriétés intracellulaires de ces neurones, nous pouvons supposer qu'ils subissaient une atténuation de leurs entrées synaptiques et de leur excitabilité intrinsèque comme c'est le cas dans le modèle barbiturique (Altwegg-

Boussac et coll., 2017). Des études réalisées dans des préparations *in vitro* ont montré que l'application de fortes doses d'isoflurane (2%) entraînait une hyperpolarisation de la membrane (Ries et Puil, 1999; Timic Stamenic et coll., 2019), une diminution des décharges toniques et burstantes (Ries et Puil, 1999b; Timic Stamenic et coll., 2019), une augmentation dose-dépendante de la conductance membranaire globale (Ries et Puil, 1999a) et une action inhibitrice sur les canaux calciques (Orestes and Todorovic, 2010). Toutes ces altérations pourraient participer à l'atténuation de l'activité spontanée et de l'excitabilité des neurones corticaux. Finalement, l'arrêt conjoint de la décharge des neurones corticaux et thalamiques provoquait l'arrêt de la décharge spontanée de la voie thalamo-corticale, participant conjointement à l'effet direct de l'isoflurane sur les neurones corticaux et à un ECoG silencieux.

3.2.2 Impact de l'état isoélectrique sur l'excitabilité intrinsèque des neurones et l'intégration sensorielle

Tout d'abord, nous avons montré que les propriétés intégratives de la membrane (i.e. R_m et T_m) des neurones corticaux restaient stables après l'extinction des activités synaptiques spontanées. Ces résultats concordent avec ceux obtenus après l'induction d'un état isoélectrique par les barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017) mais contraste avec la vision classique selon laquelle l'abolition du bruit synaptique entraînerait une augmentation des deux paramètres membranaires (Destexhe et coll., 1999, 2003; Paré et coll., 1998). L'absence de rectification membranaire dans les neurones corticaux nous permet d'exclure l'activation par l'hyperpolarisation de conductances voltage-dépendantes (Waters et Helmchen, 2006). En revanche, la potentialisation des conductances potassiques dites « de fuite » par l'isoflurane (Patel et coll., 1999) ainsi que l'ouverture des canaux K_{ATP} , en lien avec la baisse de l'activité métabolique lors d'anesthésie à l'isoflurane (Joo et coll., 2021; Nakashima et coll., 1995), pourraient provoquer une augmentation compensatrice de la conductance globale de membrane maintenant ainsi relativement stable les propriétés intégratives des neurones.

La relation entrée-sortie des neurones corticaux durant l'état isoélectrique était translatée vers la droite, indiquant une augmentation de la valeur des courants-seuil, c'est-à-dire une diminution de la sensibilité neuronale à des entrées excitatrices. Cette diminution de l'excitabilité intrinsèque des neurones corticaux est cohérente avec celle observée *in vivo* dans les neurones du cortex, thalamus et hippocampe dans le modèle barbiturique (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017) ainsi que celle mesurée dans les neurones corticaux et les motoneurones exposés à de fortes doses d'isoflurane *in vitro* (Berg-Johnsen and Langmoen, 1987; El-

Beheiry and Puil, 1989a; Sirois et coll., 1998). Cette augmentation du courant-seuil pourrait être une conséquence de l'hyperpolarisation du potentiel de membrane (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Shu et coll., 2003) et de l'action de l'isoflurane sur les conductances sodiques voltage-dépendantes (Zhao et coll., 2019). Dans notre préparation, la translation vers la droite de la relation entrée-sortie s'accompagnait aussi d'une nette augmentation de sa pente (gain neuronal) ce qui contraste avec l'apparente stabilité de ce paramètre dans le modèle barbiturique. Cette divergence entre les deux modèles suggère une potentielle action inhibitrice de l'isoflurane sur les conductances potassique calcium-dépendantes impliquées dans l'hyperpolarisation post-décharge (Berg-Johnsen et Langmoen, 1990), facilitant ainsi la décharge répétitive et donc le gain neuronal.

Le silence électro-cérébral dans modèle isoflurane était corrélé à une profonde altération de l'intégration sensorielle par les neurones corticaux, ce qui diffère de l'amplification des réponses sensorielles enregistrée dans le modèle barbituriques (Altwegg-Boussac et coll., 2017). Cette différence concorde cependant avec une l'étude *in vivo* dans le cortex auditif primaire du chat rapportant une plus forte inhibition des réponses sensorielles lors de l'anesthésie à l'isoflurane lorsque comparées à celles obtenues pendant l'anesthésie aux barbituriques (Cheung et coll., 2001). L'amplitude des potentiels postsynaptiques dépolarisants induits par la stimulation des vibrisses était diminuée de 63% durant l'état isoélectrique par rapport à l'état contrôle. Les valeurs de potentiel membranaire des neurones pyramidaux corticaux lors du silence électro-cérébral dans les deux modèles étant en moyenne plus basses que le potentiel d'inversion du chlore, il est probable que les potentiels postsynaptiques dépolarisants enregistrés soient composés de courant glutamatergiques et GABAergiques (Altwegg-Boussac et coll., 2017; Wilent et Contreras, 2004). Ces deux composantes synaptiques sont potentiellement atténuées lors de l'état isoélectrique par l'effet de l'isoflurane sur la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique (Baumgart et coll., 2015; Westphalen et coll., 2013) ou encore par l'inhibition des récepteurs glutamatergiques sur les interneurons inhibiteurs (Perouansky et coll., 1995).

L'affaiblissement de l'intégration sensorielle corticale était partiellement dû à l'atténuation de la décharge des neurones thalamiques lors des stimulations des vibrisses. Dans l'état isoélectrique induit par les barbituriques, le potentiel membranaire des neurones du VPm était nettement hyperpolarisé et nous pouvons envisager un phénomène similaire dans le modèle isoflurane (Altwegg-Boussac et coll., 2017). De plus, l'isoflurane est connu pour moduler négativement, et de manière dose-dépendante, les conductances calciques voltage-dépendantes

dans les neurones thalamo-corticaux, en particulier le courant I_T , empêchant ainsi la transition du mode de décharge tonique en décharge burstante, caractéristique de ces neurones (voir chapitre 1.1.2.2 ; Eckle et coll., 2012; Orestes et Todorovic, 2010; Ries et Puil, 1993; Timic Stamenic et coll., 2019). En accord avec cette hypothèse, une inhibition dose-dépendante par l'isoflurane de la décharge des neurones du VPM évoquée par des stimulations somesthésiques a été rapportée chez le rat *in vivo*. Finalement, il a été montré dans une préparation *in vitro* que de hautes doses d'isoflurane entraînaient une diminution de l'amplitude de la volée afférente induite par stimulation électrique dans l'hippocampe, suggérant une réduction du nombre de PAs dans les axones présynaptiques. Celle-ci était accompagnée d'un ralentissement de la conduction des PAs dans les fibres myélinisées (Berg-Johnsen and Langmoen, 1986) qui pourrait résulter de l'effet inhibiteur de l'isoflurane sur les canaux sodiques voltage-dépendant axonaux $Na_v 1.2$ (Herold and Hemmings, 2012). De telles altérations dans les neurones et les axones thalamo-corticaux pourraient, au moins en partie, expliquer l'augmentation de la latence et l'atténuation de l'amplitude des réponses synaptiques dans le cortex isoélectrique.

3.3 L'anoxie cérébrale : de complexes transitions d'états

Par deux études réalisées dans un nouveau modèle d'anoxie cérébrale transitoire *in vivo*, nous avons effectué une description multi-échelles des processus anoxiques et de leur récupération dans le cortex cérébral. Nous avons montré que l'interruption de la ventilation artificielle dans notre modèle (asphyxie) entraînait un état isoélectrique anoxique dans les zones corticales enregistrées après environ 1 min d'anoxie. Cette interruption de l'activité spontanée était précédée tout d'abord d'une période d'activité rapide (15 – 40 Hz) dans les signaux ECoG et LFP, associée à une augmentation de la fréquence et de la régularité de décharge ainsi qu'une dépolarisation du potentiel membranaire dans les neurones néocorticaux sous-jacents. Les activités corticales (ECoG, LFP et intracellulaires) étaient ensuite dominées par des oscillations de basse fréquence, prédominantes dans les couches profondes du cortex se ralentissant progressivement jusqu'à l'abolition des fluctuations de potentiels d'origine synaptique dans les signaux intracellulaires, ECoG et LFP. Ce silence électro-cérébral était ensuite interrompu après 1 à 2 min par une onde triphasique de grande amplitude, l'Onde de la Mort (OdM), initiée dans les couches profondes du cortex et se propageant, avec des vitesses similaires, dans toute la colonne corticale. Les OdM sont en réalité les représentations filtrées d'amples, et continues, transitions de potentiels intracérébraux (DC shifts) négatifs, concomitants des dépolarisations

anoxiques (AD) dans les neurones corticaux des différentes couches. Ces ADs neuronales résultaient d'un arrêt de l'activité des pompes Na/K ATPases (Na/K-p), un phénomène bien connu (Hansen, 1985; Lipton, 1999; Pietrobon et Moskowitz, 2014) que nous avons confirmé par des injections locales d'ouabaine, un bloquant spécifique des Na/K-p qui mimait dans notre préparation les ADs dues à l'anoxie. La réactivation de la ventilation artificielle entraînait dans 61 – 80 % des cas la repolarisation progressive du potentiel membranaire qui se traduisait dans le milieu extracellulaire par un DC shift de polarité opposée à celui induit par l'anoxie. Dans l'ECoG et le LFP, ce rétablissement du potentiel intracortical se traduisait par une onde moins ample et plus large que l'OdM, l'onde de la réanimation (OdR). Celle-ci annonçait systématiquement la récupération progressive de l'activité synaptique et de décharge des neurones corticaux et fluctuations de potentiel ECoG et LFP.

3.3.1 Pertinence et limites de nos modèles anoxiques

Le modèle barbiturique-anoxique: Dans notre première étude, pour établir notre modèle d'anoxie cérébrale transitoire, nous avons utilisé comme anesthésique du pentobarbital qui potentialise la transmission GABAergique en augmentant notamment le temps d'ouverture des récepteurs postsynaptiques GABA_A (Mathers et coll., 2007; Richards, 2002). L'ECoG normoxique est caractérisé par des fluctuations de potentiel de grande amplitude oscillant à des fréquences comprises entre 7 et 14 Hz rappelant les fuseaux de sommeil (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Contreras et coll., 1997; Steriade et coll., 1993a) reflétant des activités synaptiques synchrones lentes dans les neurones corticaux (Altwegg-Boussac et coll., 2014; Destexhe et coll., 2003). Dans notre première étude nous avons montré que la bouffée d'activité beta-gamma enregistrée dans l'ECoG et le LFP consécutive l'arrêt de la ventilation était corrélée dans les neurones corticaux à une décharge très régulière à 6 – 7 Hz provoquée par des oscillations rythmiques du potentiel de membrane elles-mêmes résultant de la sommation d'évènements synaptiques excitateurs et inhibiteurs à très haute fréquence (jusqu'à 130 Hz). Ce type d'activités synaptiques a été enregistré *in vitro* et *in vivo* dans les réseaux hippocampiques durant une ischémie cérébrale et résulte d'une excitation synaptique rythmée par une inhibition GABA et adénosine-dépendante (Buzsàki et coll., 1989; Dzhala et coll., 2001). L'anesthésie aux barbituriques peut avoir un effet biaisant sur l'apparente régularité de décharge des neurones corticaux. Au cours de la période d'activité accrue dans les neurones corticaux, l'augmentation de l'amplitude et de la durée des potentiels postsynaptiques inhibiteurs par le pentobarbital (Krasowski et Harrison, 1999; Wan et Puil, 2002) hyperpolarise le potentiel membranaire pour une durée plus longue. Cette hyperpolarisation durable a deux effets sur

l'efficacité de la sommation temporelle dans potentiels postsynaptiques dépolarisants : 1) elle éloigne pour une durée plus longue le potentiel membranaire du seuil de déclenchement des PAs. 2) l'augmentation de la durée d'ouverture des récepteurs postsynaptiques perméables au chlore augmente la conductance membranaire globale et shunt les potentiels postsynaptiques dépolarisants. Ainsi nous postulons que l'anesthésie aux barbituriques peut artificiellement augmenter la régularité de la décharge des neurones corticaux en lui imposant une rythmicité dépendante de la durée d'ouverture des récepteurs GABA_A. D'autre part, lors de l'anesthésie aux barbituriques, les neurones corticaux ont un potentiel de membrane plus hyperpolarisé, dont les fluctuations sont moins fréquentes et plus amples ainsi qu'une activité de décharge moins rapide que durant une anesthésie au fentanyl (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017). Cette structure de bruit synaptique se répercute sur le métabolisme neuronal, réduisant la demande énergétique des neurones corticaux (Ames, 2000; Nakashima et coll., 1995) et offrant une protection modérée contre l'anoxie (Sonnay et coll., 2017). Cette particularité pourrait alors retarder voir empêcher le développement d'AD dans les neurones corticaux (Sasaki et coll., 2005) et introduire un biais dans les mesures de délai de l'AD et de l'ODM réalisées dans notre étude.

Le modèle fentanyl-anoxique : Nous avons alors modifié notre modèle et privilégié l'utilisation de fentanyl dans notre seconde étude. De la famille des opioïdes, le fentanyl a une action inhibitrice sur la voie nociceptive descendante (Brown et coll., 2011). Lors de la sédation au fentanyl l'activité ECoG et LFP spontanée est d'apparence désynchronisée, de faible amplitude et composée d'oscillations de fréquences situées dans la bande beta-gamma (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017; Bruno et Sakmann, 2006; Mahon et coll., 2001). Au niveau intracellulaire, l'activité de décharge et la distribution moyenne du potentiel membranaire des cellules pyramidales sont comparables à celles mesurées chez l'animal éveillé (Altwegg-Boussac et coll., 2014, 2017; Mahon et coll., 2001; Rudolph et coll., 2007; Steriade et coll., 2001). L'absence d'impact direct du fentanyl sur les conductances postsynaptiques (Inoue et coll., 1994), la proximité de la pression artérielle et de l'activité corticale (ECoG et intracellulaire) enregistrées chez le rat sédaté au fentanyl avec l'animal éveillé (Bruno et Sakmann, 2006) nous a permis de limiter les potentielles interférences pharmacologiques sur les effets synaptiques de l'anoxie ou le métabolisme neuronal normoxique, nous rapprochant ainsi de conditions anoxiques rencontrées lors d'arrêts cardiaques ayant lieu hors-hôpital. Notons par ailleurs que le fentanyl permet, en plus de ses effets sédatifs et analgésiques, de favoriser un patron cortical permettant l'induction d'états pathologiques de types épileptiques similaires aux conditions

« naturelles » d'expression de la maladie (Baudin et coll., 2022; Depaulis et coll., 2016; Williams et coll., 2016).

L'approche électrophysiologique : Les enregistrements EcoG, LFP multi-site et intracellulaires ont été réalisés dans le cortex somatosensoriel primaire, en particulier les aires corticales recevant les informations en provenance des vibrisses et des membres antérieurs, site d'initiation de l'AD dans le cortex cérébral des rats (Bogdanov et coll., 2016). Bien qu'adaptée à nos études, car elle permet de capter les signaux avec une résolution temporelle très fine (< 1 ms) et à plusieurs échelles, cette approche expérimentale reste néanmoins limitée à l'étude de la propagation de l'AD le long de la colonne corticale enregistrée et ne permet pas l'observation de la totalité des fronts de propagation de l'AD (notamment latéraux) comme les techniques d'imagerie intrinsèque ou voltamétriques (Farkas et coll., 2008; Juzekava et coll., 2017; Kaufmann et coll., 2017). De plus, l'utilisation de silicone probes linéaires ne permet pas la discrimination des différents types d'AD identifiées *in vitro* comme l'AD à double initiation, où deux ADs sont initiées au niveau de deux sites adjacents menant à la rencontre de leurs fronts de propagation latéraux et une accélération de leur propagation verticale (Juzekava et coll., 2017). L'approximation linéaire de la vitesse de propagation verticale faite dans notre seconde étude peut mener à une surestimation des valeurs et expliquerait en partie la différence observée entre nos résultats et les vitesses de propagation typiquement mesurées dans la littérature (Farkas et coll., 2008; Jarvis et coll., 2001; Nasretidinov et coll., 2017). Le couplage de techniques d'enregistrement électrophysiologiques tridimensionnelles de type Utah array avec des techniques d'imagerie intrinsèque ou voltamétrique *in vivo* permettrait une visualisation plus globale de la dynamique spatio-temporelle du front de propagation de l'AD et pallier ce biais méthodologique.

3.3.2 Réversibilité de l'AD : l'Onde de la Réanimation

Dans notre protocole d'anoxie *in vivo*, la réactivation de la ventilation artificielle entraînait dans 61 – 80 % des cas l'émergence dans l'ECoG et le LFP intracortical d'une seconde onde. Nous avons nommé cette onde « onde de la réanimation » (OdR) car elle était associée à : 1) une repolarisation progressive des neurones corticaux probablement due au regain d'activité des Na/K-p, 2) une récupération de l'activité synaptique pouvant mener à une décharge de PAs, 3) le recouvrement des fluctuations de potentiel spontanées dans l'ECoG, le LFP et les neurones individuels et, 4) une annulation de la mydriase et à la reprise du réflexe pupillaire. L'OdR, tout comme l'OdM, n'apparaît pas simultanément dans toutes couches corticales, cependant nous

n'avons pas observé de site préférentiel de genèse et de front de propagation particulier. Cette désorganisation spatio-temporelle apparente dans la survenue des OdR pourrait résulter de la grande variabilité de la vitesse de repolarisation observée dans les neurones pyramidaux suivant le rétablissement de la ventilation artificielle. Nos résultats démontrent d'une part que, contrairement à la vision encore admise (Toyoda et coll., 2021), l'OdM, le DC shift anoxique et l'AD cellulaire ne sont pas synonymes d'une mort neuronale irréversible et, d'autre part, l'existence d'un biomarqueur fiable, et enregistrable par des méthodes non-invasives, d'une récupération neurophysiologique corticale après une anoxie cérébrale. Il est cependant important de considérer que l'enregistrement d'une OdR corticale n'exclue pas le développement de dommages post-anoxiques dans d'autres structures cérébrales plus sensibles au manque d'oxygène ou encore de séquelles neurologiques liées à l'état critique dans lequel les réseaux neuronaux étaient placés (Heiss et Rosner, 1983).

3.3.3 Sensibilité neuronale différentielle à l'anoxie

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les processus et atteintes cellulaires liés à l'anoxie ne se développent pas de manière homogène dans tout le cerveau (Kawai et coll., 1992; Lipton, 1999). En particulier, l'AD, ou OdM, est initiée plus tardivement dans des structures cérébrales telles que l'hypothalamus ou le tronc cérébral que dans le thalamus ou le cortex lors de privation d'oxygène et de glucose (Andrew et coll., 2017; Brisson et Andrew, 2012; Brisson et coll., 2013). Cette hétérogénéité inter-structure s'accompagne d'une sensibilité à l'anoxie différentielle au sein même de certaines structures cérébrales. Dans l'hippocampe du rat *in vitro*, l'AD provoquée par la privation d'oxygène est initiée dans les cellules pyramidales du champ Ammonien et se propage ensuite aux autres sous-compartiments hippocampiques (Aitken et coll., 1998). Dans le néocortex de rat *in vivo*, les aires somesthésiques recevant les informations en provenance des vibrisses et membres antérieurs sont les points de départ de l'AD provoquée par inspiration d'azote (Bogdanov et coll., 2016). Les sites d'initiation de l'AD au sein du néocortex sont encore sujets à de vives discussions et leur étude est éminemment dépendante des aspects méthodologiques de l'induction de l'anoxie. Lors d'ischémies locales *in vitro* et *in vivo* chez le rat, l'AD se développe plus précocement dans les couches superficielles du cortex (Kaufmann et coll., 2017; Nasretdinov et coll., 2017) alors que dans des protocoles impliquant la privation globale d'oxygène *in vitro*, l'AD a pour origine les couches granulaires corticales (Juzekaeva et coll., 2017). Dans notre cas, nous avons utilisé une préparation *in vivo* chez le rat curarisé dans laquelle l'anoxie cérébrale était induite par un arrêt de la ventilation provoquant rapidement l'interruption de l'apport de sang oxygéné à tout le

cerveau. Cette approche permettrait de préserver l'intégrité anatomo-fonctionnelle des réseaux corticaux dans les conditions normoxiques et de mimer les conditions d'anoxie cérébrale rencontrées lors d'arrêts cardiaques ou d'asphyxies. Nos résultats suggèrent que l'AD (et l'OdM correspondante) est initiée préférentiellement au niveau de deux sites dans les couches profondes du cortex. Nos résultats montrent que cette susceptibilité spécifique des couches corticales profondes à l'anoxie peut être expliquée par la demande énergétique activité-dépendante plus élevée des couches 5 – 6.

En effet, dans notre étude non publiée, les neurones corticaux de la couche 5, site d'initiation le plus fréquent de l'OdM, avaient un potentiel membranaire plus dépolarisé et une activité de décharge spontanée plus intense que ceux enregistrés en couche 2/3, non-initiatrice de l'OdM. Le nombre important d'afférences excitatrices (Markram, 1997) en provenance du thalamus (Constantinople et Bruno, 2013; Petersen, 2007) et des couches granulaires et supragranulaires (Feldmeyer, 2012; Feldmeyer et coll., 2013) reçues par la couche 5 soumet les cellules pyramidales, lors de l'éveil, à un barrage synaptique intense pouvant expliquer l'activité supraliminaire soutenue mesurée dans notre préparation au fentanyl. Nous avons également montré par des injections locales de ouabaïne que l'arrêt des Na/K-p, menant à la dépolarisation quasi-complète des neurones avoisinant le site d'injection (Balestrino et coll., 1999) pouvait entraîner, par le biais de l'augmentation de $[K^+]_e$ (Obrenovitch et Zilkha, 1995), la propagation d'une onde en tout point similaire à l'OdM induite par l'anoxie dans toute la colonne corticale enregistrée. Compte tenu de l'importante demande énergétique des processus liés à l'intégration synaptique et la genèse de PA (Ames, 2000; Attwell et Laughlin, 2001; Hansen, 1985) ainsi que la corrélation positive entre l'activité de la Na/K-p et la fréquence de décharge des neurones (Kaplan, 2002; Wang et Huang, 2006), nos résultats suggèrent fortement que la décharge soutenue des cellules pyramidales de la couche 5 pourrait être associée à une activité plus intense des Na/K-p et donc une forte consommation locale d'ATP. Elle serait l'origine de la sensibilité accrue de la couche 5 à l'anoxie et de l'initiation préférentielle de l'OdM dans celle-ci. Cette hypothèse pourrait être testée en altérant spécifiquement l'activité spontanée des couches corticales profondes par manipulation optogénétique (Bitzenhofer et coll., 2017) ou par injection locale d'antagonistes de la transmission glutamatergique n'affectant pas le développement de l'AD comme la MK-801 (Xie et coll., 1995). Lors de notre étude nous n'avons pas pu enregistrer les interneurons de la couche 5 et tester leur participation à la consommation d'ATP locale. En effet la couche 5 du cortex somatosensoriel primaire, et en particulier sa partie la plus superficielle, est une des couches corticales au rapport de densité

interneurones/neurones les plus élevés (Muroi et coll., 2009) et près de la moitié des interneurones de la couche 5 sont de la classe « fast spiking » dont l'activité de décharge durant l'éveil ou l'état « activé » est particulièrement élevée (Rudy et coll., 2011; Steriade, 2004). Il est donc hautement probable que les interneurones « fast spiking » de la couche 5 contribuent de manière non-négligeable à la haute consommation d'ATP réalisée dans celle-ci et donc à sa vulnérabilité à l'anoxie.

3.3.4 Les corrélats neuronaux des expériences de mort imminente ?

Dans nos deux études, le silence électro-cérébral induit par l'anoxie était précédé dans toutes les couches corticales et à toutes les échelles, par une nette augmentation ou un maintien temporaire des activités beta-gamma. De tels résultats ont été préalablement rapportés dans des modèles d'anoxie/ischémie cérébrale terminale chez le rat (Borjigin et coll., 2013; Vanderwolf et coll., 1988) et chez l'humain après un arrêt thérapeutique (Auyong et coll., 2010; Chawla et coll., 2009, 2017). Ces résultats ont été interprétés comme un potentiel corrélat électrophysiologique des expériences de mort imminente (EMI) (Borjigin et coll., 2013; Chawla et coll., 2009, 2017). Les EMI sont des états de conscience altérée très rares rapportés par des patients ayant survécu à des situations potentiellement mortelles telles que des arrêts cardiaques, des traumatismes crâniens violents, des états de coma prolongés ou encore des chirurgies lourdes (Greyson, 2003; Hou et coll., 2013; Van Lommel et coll., 2001). Malgré leur caractère idiosyncratique, les EMI possèdent certains aspects expérientiels communs, tels qu'un sentiment de tranquillité profonde, l'avancée vers un point lumineux, une accélération de la pensée avec une vision fulgurante de sa vie passée ou encore de vives illusions extracorporelles (Peinkhofer et coll., 2019). Bien que les activités beta-gamma ont été associées à la perception consciente et/ou à des processus mnésiques (voir chapitre 1.1.2.1.3; Fries, 2009; Slotnick et coll., 2002), les neurones corticaux que nous avons enregistré lors des périodes anoxiques d'activité neuronale accrue adoptaient des patrons de décharge réguliers, différents de la décharge d'apparence stochastique observée dans les mêmes neurones lors de l'éveil conscient et/ou de processus attentionnels (Destexhe et coll., 2003; Poulet et Crochet, 2019; Steriade et coll., 2001). Il est donc difficilement concevable que de telles activités stéréotypées puissent sous-tendre la richesse et la complexité des expériences sensorielles vécues lors des EMI. Cependant plusieurs études EEG réalisées chez l'humain ont rapporté une augmentation de la cohérence de phase fronto-pariétale (Lee et coll., 2017) et du couplage d'amplitude entre

les oscillations de fréquence gamma et thêta (Vicente et coll., 2022) précédant l'état isoélectrique péri-mortem. Ces dynamiques spatio-temporelles corticales ont été impliquées dans des processus introspectifs et mnésiques chez l'humain (Canolty et coll., 2006; Dehaene and Changeux, 2011; Frässle et coll., 2014) ainsi que des rappels de mémoire procédurale et spatiale dans des modèles animaux (Boly et coll., 2013, 2017; Wei et coll., 2015). La mesure des dynamiques de champ cortical couplé à l'activité multi-unitaire dans les aires corticales concernées pendant notre protocole d'asphyxie pourrait rapprocher nos observations de celles effectuées chez l'homme et ainsi nous permettre d'inférer de possibles implications fonctionnelles à la période d'activité neuronale accrue lors de l'anoxie cérébrale. De plus, compte tenu de la similarité entre les effets hédoniques rapportés lors des EMI et ceux éprouvés après la prise de substances psychoactives comme la kétamine ou la N,N-Diméthyltryptamine (DMT) (Martial et coll., 2019; Timmermann et coll., 2018), les EMI pourraient être accompagnées d'un relargage massif de sérotonine, un phénomène qui pourrait être confirmé par des enregistrements de l'activité neuronale au sein des noyaux du raphé après privation d'oxygène. Finalement, le rapport verbal d'EMI nécessite une réanimation cardio-respiratoire réussie et un recouvrement des fonctions neurologiques et cognitives. Ainsi, on ne peut pas démontrer que les EMIs sont des phénomènes accompagnant spécifiquement le processus de mort. Dans notre première étude, nous avons observé que le délai de récupération d'une activité synaptique et de décharge normoxique était bien plus long que celui de la mise au silence cortical suivant l'anoxie. La période de récupération de l'anoxie serait donc vraisemblablement plus adaptée à l'établissement des EMIs. Le processus de réanimation était caractérisé par une prédominance d'oscillations rythmiques dans l'ECOG et le signal intracellulaire de fréquence comprise entre 5 et 10 Hz et une atténuation des activités à haute fréquence (> 30Hz). De telles dynamiques corticales ont été observées lors d'épisodes hallucinatoires symptomatique de la schizophrénie (Uhlhaas et Singer, 2010). Il est donc plausible que cette désorganisation du patron d'activité ECOG caractérisée par un déficit d'activités à haute fréquence, en particulier dans les aires sensorielles, soit responsable de l'imagerie mentale hallucinatoire constituant certains aspects expérientiels des EMIs (Morse et Neppe, 1991). Nous émettons donc l'hypothèse que la période de récupération de l'activité cérébrale suivant la ré-oxygénation cérébrale serait une période adaptée à l'étude des processus électrophysiologiques sous-tendant les EMIs.

3.4 Diversité des états isoélectriques

3.4.1 Conséquences cliniques et fonctionnelles des états isoélectriques pharmacologiques

Nous avons vu que dans le cas d'une induction pharmacologique par les éthers halogénés ou les barbituriques, l'état isoélectrique n'est pas synonyme d'une suspension de l'excitabilité neuronale et de l'intégration d'informations périphériques dans les réseaux centraux. Ces résultats sont en désaccord l'idée dominante que tout tracé isoélectrique reflète à une abolition de l'excitabilité neuronale (Ferron et coll., 2009; Kroeger and Amzica, 2007) et à une absence totale de réponse à des stimulations sensorielles (André-Obadia et coll., 2014; Kirshbaum and Carollo, 1970; Kroeger et coll., 2013). L'induction d'un état isoélectrique pharmacologique, le plus souvent par administration de fortes doses de barbituriques, est le seul moyen d'arrêter les périodes de crise lors d'états de mal épileptiques hyper-réfractaires (Claassen et coll., 2002). Ce traitement est particulièrement lourd et peut durer plusieurs jours ce qui implique de possibles effets à long-terme sur les fonctions neuronales et cérébrales. Par exemple le développement de plasticité d'excitabilité intrinsèque homéostatique (Kim et Linden, 2007; Turrigiano et coll., 1994) ou de dépression de la transmission synaptique excitatrice (Turrigiano et coll., 1998). La démonstration d'une persistance d'excitabilité des réseaux corticaux permet de reconsidérer l'état fonctionnel du cortex silencieux et d'envisager une nouvelle procédure thérapeutique qui pourrait palier aux conséquences délétères d'un état isoélectrique prolongé. Ainsi, des protocoles de stimulations, par exemple de stimulations magnétiques ou en courant continu transcrâniennes (celles ayant des effets excitateurs), pourrait permettre un maintien relatif des propriétés neuronales à leurs niveaux antérieurs au coma isoélectrique.

Sur la base du formalisme de la théorie de l'information (Shannon, 1948) utilisée pour interpréter les patrons temporels de décharge comme une séquence de 1 et 0 (Reinagel, 2000), le contenu informationnel de l'état isoélectrique est nul, le cerveau ne transmettant alors aucun 'bit' d'information. Cependant, la fiabilité et reproductibilité accrues de la réponse synaptique couplées à l'augmentation de la précision temporelle de la décharge en réponse à une stimulation sensorielle (Altwegg-Boussac et coll., 2017) indique un renforcement de l'association stimulus-réponse dans la condition isoélectrique. Ainsi, le « transfert informationnel » entre les stimuli périphériques et les neurones corticaux est exempt d'interférences liées au bruit synaptique, principale source de la variabilité des réponses

(Altwegg-Boussac et coll., 2014; Nolte et coll., 2019). Ce renforcement de la relation déterministe entre réponse cellulaire et stimulus ferait donc du neurone silencieux un meilleur indicateur des entrées périphériques. Mais, compte tenu de la faible probabilité de décharge associée aux stimulations sensorielles, « l'information mutuelle » du couple stimulus-réponse reste basse (Reinagel, 2000). Selon ce formalisme, le cerveau isoélectrique pourrait donc être considéré comme un « récepteur paradoxal » de l'information périphérique au faible mais extrêmement fiable et stéréotypé « transfert informationnel ».

3.4.2 A la recherche de biomarqueurs de la mort et de la réanimation

Les recherches portant sur l'anoxie cérébrale, cause finale de la mort (Laureys, 2005), ont pour buts d'identifier des biomarqueurs fiables pouvant décrire l'avancée des processus anoxiques dans le cerveau et un insaisissable point de non-retour à partir duquel toute réanimation cardio-respiratoire serait inefficace.

Premièrement notre travail a permis de confirmer que les modifications d'activité corticale suivant l'anoxie pourraient constituer lesdits biomarqueurs et nous permettre d'établir un modèle fiable de l'évolution du processus de mort. Il est maintenant clair que la dégradation progressive de l'activité corticale en réponse à une anoxie cérébrale de longue durée rend la conception de la mort comme une transition d'état abrupte caduque. Nous pouvons ici proposer un modèle de mort se basant sur la séquence stéréotypée de transitions progressives d'état électro-cérébraux, enregistrés à plusieurs échelles, consistant en : (1) une période « latente » durant laquelle aucune modification d'activité corticale significative n'est détectable ; (2) une prédominance d'activités à haute fréquence suivie de, (3) un patron oscillatoire d'activité électrique à basse fréquence s'atténuant et se ralentissant jusqu'à l'extinction ; (4) un état isoélectrique activable et (5) le développement d'une AD cellulaire massive reflétée dans l'ECOG et le LFP par l'OdM. Cependant nous avons démontré que l'OdM n'est pas un phénomène cérébrale irréversible puisque la réoxygénation du cerveau peut entraîner le recouvrement de l'homéostasie cellulaire indiqué par l'OdR (6) qui annonce la récupération des propriétés neuronales et de l'activité corticale spontanée (7).

D'autre part, à la lumière de nos résultats et de leur surprenante reproductibilité, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'état isoélectrique anoxique est pluriel et que sa

classification pourrait se faire sur la base des potentialités d'excitation neuronale. La dégradation progressive des activités corticales suivant la séquence précédemment décrite, conséquence de l'arrêt métabolique, mène irrémédiablement au silence électrique dans les réseaux et neurones corticaux. A ce moment, l'application directe d'échelons de courant hyperpolarisants met en évidence le maintien des propriétés de membrane des neurones puisqu'ils sont encore capables de montrer une réponse en voltage à une entrée de courant. En l'absence de réoxygénation cérébrale, les neurones corticaux se dépolarisent totalement en conséquence de l'arrêt de l'activité des Na/K-p (dépolarisation anoxique). Les neurones entrent alors dans un second état, tout aussi silencieux mais complètement aréactif puisqu'associé à l'annulation du gradient électrochimique, à une suppression de la résistivité de membrane, et à une mydriase complète, signe indirect de l'inactivation des noyaux du tronc cérébral. Cet état remplit alors la plupart des critères nécessaires à l'établissement d'un diagnostic de mort encéphalique excepté l'irréversibilité de l'état de coma (Wijdicks, 2001). Lors de la repolarisation suivant la restauration de la ventilation artificielle, les neurones récupèrent progressivement leur capacité d'activation comme le montre la décharge de PAs d'amplitude croissante lors de la levée de l'hyperpolarisation imposée par le courant. Les neurones reviennent ainsi à un état isoélectrique moins péjoratif, inactif mais activable, jusqu'à ce que l'apport en oxygène au cerveau permette le rétablissement d'une activité synaptique spontanée au sein des réseaux corticaux.

3.4.3 Un canal pour les inhiber tous et dans le silence les lier

L'administration de doses croissantes de substances anesthésiques potentialisatrices de la transmission GABAergique comme les éthers halogénés, les barbituriques ou encore le propofol, est inversement corrélée au métabolisme cérébral du glucose (Alkire, 1998; Alkire et coll., 1995, 1997; Nakashima et coll., 1995) qui peut être réduit de 50% après l'induction d'un état isoélectrique par l'isoflurane ou les barbituriques (Nakashima et coll., 1995). Dans le cas des anesthésiques, on pourrait considérer que l'abolition de l'activité cérébrale est la cause de cette diminution d'activité métabolique, mais on peut mettre en évidence une boucle interdépendante. En effet les barbituriques et les éthers halogénés ont une action inhibitrice sur l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la respiration mitochondriale (La Monaca et Fodale, 2012) et annulent le potentiel membranaire des mitochondries (Kishikawa et coll., 2018), limitant les niveaux d'ATP intracellulaire. La concentration d'ATP intracellulaire

diminuant avec l'augmentation des doses d'anesthésiants met en jeu les canaux K_{ATP} (Ashcroft et Ashcroft, 1990), dont le taux d'ouverture croissant a été associé à l'adoption par les réseaux neuronaux de patrons d'activité oscillatoires progressivement ralentis jusqu'au patron B-S *in silico* (Joo et coll., 2021) et dont l'activation par le diazoxide abolie l'activité synaptique spontanée dans les neurones corticaux *in vitro* (Cunningham et coll., 2006). La mise au silence électrique des neurones corticaux et la stabilité des propriétés passives de membrane durant les états isoélectrique pharmacologiques seraient donc dues en grande partie à de l'ouverture des canaux K_{ATP} .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la température a un effet drastique sur l'activité spontanée des neurones et de leurs réseaux (voir chapitre 1.3.4.3). La diminution forcée de la température cérébrale sous la barre des 20°C est susceptible d'induire un état isoélectrique chez le chien, le rat et l'humain (Jia et coll., 2006; Michenfelder and Milde, 1991; Reilly, 1989; Stecker et coll., 2001). Le refroidissement cérébral physiologique, ayant lieu lors de la torpeur chez les animaux hibernants, a lui aussi été associé à une abolition des fluctuations de potentiel EEG (Harding et coll., 2019). Dans ces deux conditions, la consommation d'oxygène et le métabolisme du glucose sont positivement corrélés à la température cérébrale ou centrale (Michenfelder et Milde, 1991; Nakashima et coll., 1995; Tøien et coll., 2011). Par exemple, chez le rat *in vivo*, la réduction de la température crânienne jusque 28°C entraînait une réduction de la consommation de glucose de 50%, similaire aux valeurs mesurée lors des états isoélectriques pharmacologiques (Nakashima et coll., 1995). Toutefois, une question demeure : l'état isoélectrique hypothermique est-il la cause ou la conséquence de la diminution du métabolisme respiratoire cérébral ? Dans les conditions normoxiques, le refroidissement général entraîne une nette diminution du débit sanguin cérébral et donc de l'apport en oxygène au cerveau (Yenari and Han, 2012). De plus, chez les animaux non-hibernants l'exposition à de longues périodes hypothermiques entraîne des réponses de stress thermique dans les neurones qui modulent négativement la synthèse d'ATP (Carey et coll., 2003; Henriksen, 2002). Bien qu'à notre connaissance, aucune étude n'a encore explicité le lien potentiel entre la température cérébrale, la concentration intracellulaire d'ATP et l'ouverture des canaux K_{ATP} neuronaux, nous postulons qu'une relation analogue à celle établie entre les anesthésiants et le métabolisme cérébral pourrait être responsable de la suppression d'activité spontanée dans les neurones refroidis.

Dans notre modèle anoxique, l'arrêt de la ventilation artificielle entraîne des transitions rapides de patrons d'activité ECoG et LFP. En particulier, l'activité des réseaux corticaux est dominée

par des oscillations de fréquence 1 – 5 Hz après ~45s d'anoxie avant d'entrer dans un état isoélectrique, 15 – 20 s plus tard. Nous avons vu qu'à ce moment, le signal SpO₂ est passé sous le seuil de détection de notre matériel et le rythme cardiaque a été diminué d'environ 50%. Ces mesures suggèrent une baisse importante de la perfusion cérébrale, impliquée dans le ralentissement puis l'extinction des activités synaptiques (Ammirati et coll., 1998; Clute and Levy, 1990; Hofle et coll., 1997). Lors d'ischémie ou d'anoxie cérébrale *in vivo*, l'arrêt soudain de la perfusion cérébrale entraîne la chute de la concentration d'ATP intracellulaire jusque ~45% de sa valeur basale après 1 min (Lipton, 1999). Dans ces conditions, la chute des concentrations d'ATP intracellulaire entraîne une ouverture massive des K_{ATP}, hyperpolarisant le potentiel de membrane des neurones et shuntant les entrées synaptiques jusqu'à l'extinction des fluctuations de potentiel membranaire (Cunningham et coll., 2006; Jiang and Haddad, 1997). L'induction de l'état isoélectrique dans notre modèle pharmacologique se fait plus lentement que dans le modèle anoxique et les transitions d'état cérébral sont plus facilement discriminables. De plus, un état isoélectrique pharmacologique prolongé ne mène pas au développement d'une AD dans les neurones corticaux. Nous avons pu mesurer que, lors d'un état isoélectrique pharmacologique, le rythme cardiaque diminuait de 0,5 bpm/s pour atteindre sa valeur minimale de ~300 bpm (diminution de 20%) et que les valeurs de SpO₂ restaient stables. La perfusion cérébrale et donc la synthèse d'ATP, bien que réduites, sont maintenues plus longtemps, permettant la persistance d'une concentration en ATP supérieure à 1 nmol/kg, seuil mesuré lors de l'initiation de l'AD *in vitro* (Ekholm et coll., 1993). Les concentrations d'ATP diminuent plus lentement dans le modèle pharmacologique. Ceci permet une transition d'état progressive et lente (environ 25 min pour le modèle barbiturique), d'un état cérébral dominé par les activités lentes vers le silence électro-cérébral en passant par l'état B-S. Cette transition d'état graduelle est assurée en partie par la mise en jeu des canaux K_{ATP} (Alkire et coll., 1997; Joo et coll., 2021; Nakashima et coll., 1995). Cette induction lente de l'état isoélectrique contraste avec la cinétique de transition d'état très rapide (de l'ordre de la dizaine de secondes) observée dans notre modèle d'anoxie cérébrale due à la chute des niveaux d'ATP dans le cerveau.

Bien que les états isoélectriques décrits dans nos études diffèrent par leur cinétique d'induction et leurs propriétés neurophysiologiques, nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'ouverture des canaux K_{ATP} en lien avec la dégradation du métabolisme neuronal, commune à tous nos modèles, est un facteur indispensable de la mise au silence des neurones et réseaux corticaux. La mesure du décours temporel de la concentration intracellulaire d'ATP (Dale, 2021) couplée

à des enregistrements ECoG et LFP dans nos différents modèles en présence et absence de tolbutamine, inhibiteur spécifique des canaux K_{ATP} , pourrait établir la nécessité de l'ouverture du canal dans la mise au silence des réseaux corticaux.

Références bibliographiques

Adrian, E.D., and Matthews, B.H.C. (1934). The Berger Rhythm: Potential Changes from The Occipital Lobes in Man. *Brain* 57, 355–385.

Aitken, P.G., Tombaugh, G.C., Turner, D.A., and Somjen, G.G. (1998). Similar propagation of SD and hypoxic SD-like depolarization in rat hippocampus recorded optically and electrically. *J. Neurophysiol.* 80, 1514–1521.

Akk, G., and Steinbach, J.H. (2000). Activation and block of recombinant GABA(A) receptors by pentobarbitone: A single-channel study. *Br. J. Pharmacol.* 130, 249–258.

Aksenov, D.P., Miller, M.J., Dixon, C.J., and Wyrwicz, A.M. (2019). The effect of sevoflurane and isoflurane anesthesia on single unit and local field potentials. *Exp. Brain Res.*

Alkire, M.T. (1998). Quantitative EEG correlations with brain glucose metabolic rate during anesthesia in volunteers. *Anesthesiology* 89, 323–333.

Alkire, M.T., Haier, R.J., Barker, S.J., Shah, N.K., Wu, J.C., and Kao, Y.J. (1995). Cerebral metabolism during propofol anesthesia in humans studied with positron emission tomography. *Anesthesiology* 82, 393–403.

Alkire, M.T., Haier, R.J., Shah, N.K., and Anderson, C.T. (1997). Positron emission tomography study regional cerebral metabolism in humans during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 86, 549–557.

Alkire, M.T., Hudetz, A.G., and Tononi, G. (2008). Consciousness and Anesthesia. *Science* (80-.). 322, 876–880.

Allen, N.J., and Attwell, D. (2004). The effect of simulated ischaemia on spontaneous GABA release in area CA1 of the juvenile rat hippocampus. *J. Physiol.* 561, 485–498.

Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Mahon, S., and Charpier, S. (2014). Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J. Physiol.* 592, 3577–3595.

Altwegg-Boussac, T., Mahon, S., Chavez, M., Charpier, S., and Schramm, A.E. (2016). Induction of an isoelectric brain state to investigate the impact of endogenous synaptic activity on neuronal excitability in vivo. *J. Vis. Exp.* 1–7.

Altwegg-Boussac, T., Schramm, A.E., Ballesterio, J., Grosselin, F., Chavez, M., Lecas, S., Baulac, M., Naccache, L., Demeret, S., Navarro, V., et coll. (2017). Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain* 140, 2381–2398.

Alving, J., Møller, M., Sindrup, E., and Lyager Nielsen, B. (1979). “Alpha pattern coma” following cerebral anoxia. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 47, 95–101.

Ames, A. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* 34, 42–68.

Ammirati, F., Colivicchi, F., Di Battista, G., Garelli, F.F., and Santini, M. (1998). Electroencephalographic correlates of vasovagal syncope induced by head-up tilt testing. *Stroke* 29, 2347–2351.

Amodio, P., and Montagnese, S. (2015). Clinical neurophysiology of hepatic encephalopathy. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5, S60–S68.

Amzica, F. (2015). What does burst suppression really mean? *Epilepsy Behav.*

Amzica, F., and Lopes da Silva, F.H. (2005). Cellular Substrates of Brain Rhythms. In *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, pp. 33–63.

Amzica, F., and Neckelmann, D. (1999). Membrane capacitance of cortical neurons and glia during sleep oscillations and spike-wave seizures. *J. Neurophysiol.* 82, 2731–2746.

Amzica, F., and Steriade, M. (1997). The K-complex: Its slow (<1-Hz) rhythmicity and

relation to delta waves. *Neurology* 49, 952–959.

Amzica, F., and Steriade, M. (1998). Electrophysiological correlates of sleep delta waves. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 107, 69–83.

Amzica, F., and Steriade, M. (2000). Integration of low-frequency sleep oscillations in corticothalamic networks. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 60, 229–245.

André-Obadia, N., Sauleau, P., Cheliout-Heraut, F., Convers, P., Debs, R., Eisermann, M., Gavaret, M., Isnard, J., Jung, J., Kaminska, A., et coll. (2014). Recommandations françaises sur l'électroencéphalogramme. *Neurophysiol. Clin.* 44, 515–612.

Andrew, R.D., Hsieh, Y.T., and Brisson, C.D. (2017). Spreading depolarization triggered by elevated potassium is weak or absent in the rodent lower brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1735–1747.

Ashcroft, S.J.H., and Ashcroft, F.M. (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell. Signal.* 2, 197–214.

Astrup, J., Sørensen, P.M., and Sørensen, H.R. (1981). Oxygen and glucose consumption related to Na⁺-K⁺ transport in canine brain. *Stroke* 12, 726–730.

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.

Auyong, D.B., Klein, S.M., Gan, T.J., Roche, A.M., Olson, D., and Habib, A.S. (2010). Processed electroencephalogram during donation after cardiac death. *Anesth. Analg.* 110, 1428–1432.

Azouz, R., and Gray, C.M. (1999). Cellular Mechanisms Contributing to Response Variability of Cortical Neurons In Vivo. *J. Neurosci.* 19, 2209–2223.

Balestrino, M. (1995). Pathophysiology of anoxic depolarization: new findings and a working hypothesis. *J. Neurosci. Methods* 59, 99–103.

Balestrino, M., Young, J., and Aitken, P. (1999). Block of (Na⁺,K⁺)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res.* 838, 37–44.

- Barrett, E.F., Barrett, J.N., Botz, D., Chang, D.B., and Mahaffey, D. (1978). Temperature-sensitive aspects of evoked spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* *279*, 253–273.
- Battaglia, F.P., Sutherland, G.R., and McNaughton, B.L. (2004). Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical “up-state” transitions. *Learn. Mem.* *11*, 697–704.
- Baudin, P., Whitmarsh, S., Cousyn, L., Roussel, D., Lecas, S., Lehongre, K., Charpier, S., Mahon, S., and Navarro, V. (2022). Kv1.1 channels inhibition in the rat motor cortex recapitulates seizures associated with anti-LGI1 encephalitis. *Prog. Neurobiol.* *213*.
- Baudoux, S., Empson, R.M., and Richards, C.D. (2003). Pentobarbitone modulates calcium transients in axons and synaptic boutons of hippocampal CA1 neurons. *Br. J. Pharmacol.* *140*, 971–979.
- Baumgart, J.P., Zhou, Z.-Y., Hara, M., Cook, D.C., Hoppa, M.B., Ryan, T.A., and Hemmings, H.C. (2015). Isoflurane inhibits synaptic vesicle exocytosis through reduced Ca²⁺ influx, not Ca²⁺-exocytosis coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 11959–11964.
- Baumgartner, G., Creutzfeldt, Q., and Jung, R. (1961). Cerebral anoxia and the electroencephalogram.
- Beck, A. (1890). Die Bestimmung der Localisation des Gehirn- und Rückenmarksfunctionen Vermittelst der Electricischen Erscheinungen. *Cent. Für Physiol.* *4*, 473–476.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* *57*, 289–300.
- Berg-Johnsen, J., and Langmoen, I.A. (1986). The effect of isoflurane on unmyelinated and myelinated fibres in the rat brain. *Acta Physiol Scand* *127*, 87–93.
- Berg-Johnsen, J., and Langmoen, I.A. (1987). Isoflurane hyperpolarizes neurones in rat and human cerebral cortex. *Acta Physiol. Scand.* *130*, 679–685.
- Berg-Johnsen, J., and Langmoen, I.A. (1990). Mechanisms concerned in the direct effect of isoflurane on rat hippocampal and human neocortical neurons. *Brain Res.* *507*, 28–34.
- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Dtsch. Medizinische*

Wochenschrift 60, 1947–1949.

Berger, H. (1931). Das Elektrenkephalogramm des Menschen: Dritte Mitteilung. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 94, 16–60.

Binshtok, A.M., Fleidervish, I.A., Sprengel, R., and Gutnick, M.J. (2006). NMDA receptors in layer 4 spiny stellate cells of the mouse barrel cortex contain the NR2C subunit. J. Neurosci. 26, 708–715.

Binzegger, T., Douglas, R.J., and Martin, K.A. (2004). A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. J. Neurosci. 24, 8441–8453.

Bitzenhofer, S.H., Ahlbeck, J., Wolff, A., Wiegert, J.S., Gee, C.E., Oertner, T.G., and Hanganu-Opatz, I.L. (2017). Layer-specific optogenetic activation of pyramidal neurons causes beta-gamma entrainment of neonatal networks. Nat. Commun. 8.

Bogdanov, V.B., Middleton, N.A., Theriot, J.J., Parker, P.D., Abdullah, O.M., Ju, Y.S., Hartings, J.A., and Brennan, K.C. (2016). Susceptibility of Primary Sensory Cortex to Spreading Depolarizations. J. Neurosci. 36, 4733–4743.

Bollimunta, A., Chen, Y., Schroeder, C.E., and Ding, M. (2008). Neuronal mechanisms of cortical alpha oscillations in awake-behaving macaques. J. Neurosci. 28, 9976–9988.

Boly, M., Seth, A.K., Wilke, M., Ingmundson, P., Baars, B., Laureys, S., Edelman, D.B., and Tsuchiya, N. (2013). Consciousness in humans and non-human animals: Recent advances and future directions. Front. Psychol. 4, 1–20.

Boly, M., Massimini, M., Tsuchiya, N., Postle, B.R., Koch, C., and Tononi, G. (2017). Are the Neural Correlates of Consciousness in the Front or in the Back of the Cerebral Cortex? Clinical and Neuroimaging Evidence. J. Neurosci. 37, 9603–9613.

Borjigin, J., Lee, U., Liu, T., Pal, D., Huff, S., Klarr, D., Sloboda, J., Hernandez, J., Wang, M.M., and Mashour, G.A. (2013). Surge of neurophysiological coherence and connectivity in the dying brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 14432–14437.

Borst, J.G.G., and Sakmann, B. (1998). Facilitation of presynaptic calcium currents in the rat brainstem. J. Physiol. 513, 149–155.

- Bragina, L., Fattorini, G., Giovedi, S., Melone, M., Bosco, F., Benfenati, F., and Conti, F. (2012). Analysis of synaptotagmin, SV2, and Rab3 expression in cortical glutamatergic and GABAergic axon terminals. *Front. Cell. Neurosci.* 5, 1–9.
- Brenner, R.P. (2005). The interpretation of the EEG in stupor and coma. *Neurologist* 11, 271–284.
- Brenner, R.P., and Schaul, N. (1990). Periodic EEG patterns: Classification, clinical correlation, and pathophysiology. *J. Clin. Neurophysiol.* 7, 249–268.
- Brisson, C.D., and Andrew, R.D. (2012). A neuronal population in hypothalamus that dramatically resists acute ischemic injury compared to neocortex. *J. Neurophysiol.* 108, 419–430.
- Brisson, C.D., Lukewich, M.K., and Andrew, R.D. (2013). A distinct boundary between the higher brain's susceptibility to ischemia and the lower brain's resistance. *PLoS One* 8, 1–14.
- Brisson, C.D., Hsieh, Y.T., Kim, D., Jin, A.Y., and Andrew, R.D. (2014). Brainstem neurons survive the identical ischemic stress that kills higher neurons: Insight to the persistent vegetative state. *PLoS One* 9.
- Brown, D.J.A., Brugger, H., Boyd, J., and Paal, P. (2013). Accidental hypothermia. *New Engl. J. Med.* 367, 1930–1938.
- Brown, E.N., Lydic, R., and Schiff, N.D. (2010). General Anesthesia, Sleep, and Coma. *New Engl. J. Med.* 363.
- Brown, E.N., Purdon, P.L., and Van Dort, C.J. (2011). General Anesthesia and Altered States of Arousal: A Systems Neuroscience Analysis. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 601–628.
- Bruno, R.M., and Sakmann, B. (2006). Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* (80-.). 312, 1622–1627.
- Bullock, T.H., McClune, M.C., and Enright, J.T. (2003). Are the electroencephalograms mainly rhythmic? Assessment of periodicity in wide-band time series. *Neuroscience* 121, 233–252.
- Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33, 1–16.

- Buzsáki, G. (2004). Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 7, 446–451.
- Buzsáki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* (80-). 304, 1926–1929.
- Buzsáki, G., Czopf, J., Kondákor, I., and Kellényi, L. (1986). Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: Current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res.* 365, 125–137.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C.A., and Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 407–420.
- Buzsáki, G., Logothetis, N., and Singer, W. (2013). Scaling brain size, keeping timing: Evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron* 80, 751–764.
- Buzsáki, G., Freund, T.F., Bayardo, F., and Somogyi, P. (1989). Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. *Exp. Brain Res.* 78, 268–278.
- Campagna, J.A., Miller, K.W., and Forman, S.A. (2003). Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. *N. Engl. J. Med.* 348, 2110–2124.
- Canolty, R.T., Edwards, E., Dalal, S.S., Soltani, M., Nagarajan, S.S., Kirsch, H.E., Berger, M.S., Barbare, N.M., and Knight, R.T. (2006). High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science* (80-). 313, 1626–1628.
- Cardin, J.A., Palmer, L.A., and Contreras, D. (2008). Cellular Mechanisms Underlying Stimulus-Dependent Gain Modulation in Primary Visual Cortex Neurons In Vivo. *Neuron* 59, 150–160.
- Carey, H. V., Andrews, M.T., and Martin, S.L. (2003). Mammalian hibernation: Cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* 83, 1153–1181.
- Carlson, A.P., Shuttleworth, C.W., Major, S., Lemale, C.L., Dreier, J.P., and Hartings, J.A. (2019). Terminal spreading depolarizations causing electrocortical silencing prior to clinical brain death: Case report. *J. Neurosurg.* 131, 1773–1779.
- Carroll, W.M., and Mastaglia, F.L. (1979). Alpha and beta coma in drug intoxication

uncomplicated by cerebral hypoxia. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 46, 95–105.

Caspers, H., Speckmann, E.J., and Lehmenkühler, A. (1987). DC potentials of the cerebral cortex. Seizure activity and changes in gas pressures. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 106, 127–178.

Caton, D. (2000). John Snow's practice of obstetric anesthesia. *Anesthesiology* 92, 247–252.

Caton, R. (1875). The Electric Currents of the Brain. *Br. J. Med.* 610.

Chagnac-Amitai, Y., and Connors, B.W. (1989). Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.* 62, 1149–1162.

Chance, F.S., Abbott, L.F., and Reyes, A.D. (2002). Gain modulation from background synaptic input. *Neuron* 35, 773–782.

Chang, B.S., Schomer, D.L., and Niedermeyer, E. (2012). Normal EEG and Sleep: Adults and Elderly. In *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields*. Sixth Edition, pp. 183–212.

Charlesworth, P., Jacobson, I., and Richards, C.D. (1995). Pentobarbitone modulation of NMDA receptors in neurons isolated from the rat olfactory brain. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3005–3013.

Charpier, S., Mahon, S., and Deniau, J.M. (1999). In vivo induction of striatal long-term potentiation by low-frequency stimulation of the cerebral cortex. *Neuroscience* 91, 1209–1222.

Charpier, S., Pidoux, M., and Mahon, S. (2020). Converging sensory and motor cortical inputs onto the same striatal neurons : An in vivo intracellular investigation. *PLoS One* 1–16.

Chatrian, G.E., White, L.E., and Daly, D. (1963). Electroencephalographic patterns resembling those of sleep in certain comatose states after injuries to the head. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 15, 272–280.

Chatrian, G.E., Bergamini, L., Dondey, M., Klass, D.W., Lennox-Buchthal, M., and Petersén, I. (1974). A glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 37, 538–548.

- Chauvette, S., Crochet, S., Volgushev, M., and Timofeev, I. (2011). Properties of slow oscillation during slow-wave sleep and anesthesia in cats. *J. Neurosci.* *31*, 14998–15008.
- Chawla, L.S., Akst, S., Junker, C., Jacobs, B., and Seneff, M.G. (2009). Surges of electroencephalogram activity at the time of death: A case series. *J. Palliat. Med.* *12*, 1095–1100.
- Chawla, L.S., Terek, M., Junker, C., Akst, S., Yoon, B., Brasha-Mitchell, E., and Seneff, M.G. (2017). Characterization of End of Life Electroencephalographic Surges in Critically Ill Patients. *Death Stud.* *41*, 385–392.
- Cheng, G., and Kendig, J.J. (2000). Enflurane directly depresses glutamate AMPA and NMDA currents in mouse spinal cord motor neurons independent of actions on GABA(A) or glycine receptors. *Anesthesiology* *93*, 1075–1084.
- Cheung, S.W., Nagarajan, S.S., Bedenbaugh, P.H., Schreiner, C.E., Wang, X., and Wong, A. (2001). Auditory cortical neuron response differences under isoflurane versus pentobarbital anesthesia. *Hear. Res.* *156*, 115–127.
- Chung, S., Li, X., and Nelson, S.B. (2002). Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* *34*, 437–446.
- Claassen, J., Hirsch, L.J., Emerson, R.G., and Mayer, S.A. (2002). Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam: A systematic review. *Epilepsia* *43*, 146–153.
- Clute, H.L., and Levy, W.J. (1990). Electroencephalic changes during brief cardiac arrest in humans. *Anesthesiology* *73*, 821–825.
- Coenen, A., and Zayachkivska, O. (2013). Adolf Beck: A pioneer in electroencephalography in between Richard Caton and Hans Berger. *Adv. Cogn. Psychol.* *9*, 216–221.
- Collins, G.G.S. (1980). Release of endogenous amino acid neurotransmitter candidates from rat olfactory cortex slices: possible regulatory mechanisms and the effects of pentobarbitone. *Brain Res.* *190*, 517–528.
- Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2011). Effects and mechanisms of wakefulness on local cortical networks. *Neuron*.

- Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2013a). Deep Cortical Layers are activated Directly by Thalamus. *Science* (80-.). *1591*, 1591–1594.
- Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2013b). Deep cortical layers are activated directly by thalamus (Supp. Material). *Science* (80-.). *340*, 1591–1594.
- Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2013c). Deep Cortical Layers Are Activated Directly by Thalamus (Supplementary Materials). *Science* (80-.). *340*, 1591–1594.
- Contreras, D., and Steriade, M. (1995). Cellular basis of EEG slow rhythms: A study of dynamic corticothalamic relationships. *J. Neurosci.* *15*, 604–622.
- Contreras, D., Destexhe, A., Sejnowski, T.J., and Steriade, M. (1997). Spatiotemporal patterns of spindle oscillations in cortex and thalamus. *J. Neurosci.* *17*, 1179–1196.
- Cook, D.L., and Hales, N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* *311*, 271–273.
- Crunelli, V., Lightowler, S., and Pollard, C.E. (1989). A T-type Ca²⁺ current underlies low-threshold Ca²⁺ potentials in cells of the cat and rat lateral geniculate nucleus. *J. Physiol.* *413*, 543–561.
- Cunningham, E.T., and Levay, S. (1986). Laminar and synaptic organization of the projection from the thalamic nucleus centralis to primary visual cortex in the cat. *J. Comp. Neurol.* *254*, 65–77.
- Cunningham, M.O., Pervouchine, D.D., Racca, C., Kopell, N.J., Davies, C.H., Jones, R.S.G., Traub, R.D., and Whittington, M.A. (2006). Neuronal metabolism governs cortical network response state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5597–5601.
- Czéh, G., Aitken, P.G., and Somjen, G.G. (1993). Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization. *Brain Res.* *632*, 195–208.
- Dale, N. (2021). Real-time measurement of adenosine and ATP release in the central nervous system. *Purinergic Signal.* *17*, 109–115.
- Dan, B., and Boyd, S.G. (2006). Spiking in Burst-Suppression in Children : Implications for

Management of Refractory Status Epilepticus. *Epileptic Disord.* 8, 143–150.

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.

Dehaene, S., and Changeux, J.P. (2011). Experimental and Theoretical Approaches to Conscious Processing. *Neuron* 70, 200–227.

Dement, W., and Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 9, 673–690.

Depaulis, A., David, O., and Charpier, S. (2016). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J. Neurosci. Methods* 260, 159–174.

DeRubeis, D.A., and Young, G.B. (2001). Continuous EEG monitoring in a patient with massive carbamazepine overdose. *J. Clin. Neurophysiol.* 18, 166–168.

Destexhe, A., Paré, D., Willmore, B.D.B., Cooke, J.E., King, A.J., and Physiol, J. (1999). Impact of Network Activity on the Integrative Properties of Neocortical Pyramidal Neurons In Vivo. *J. Neurophysiol.* 81, 1531–1547.

Destexhe, A., Rudolph, M., and Paré, D. (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 739–751.

Destexhe, A., Hughes, S.W., Rudolph, M., and Crunelli, V. (2007). Are corticothalamic “up” states fragments of wakefulness? *Trends Neurosci.* 30, 334–342.

Dijkstra, K., Hofmeijer, J., van Gils, S.A., and van Putten, M.J.A.M. (2016). A biophysical model for cytotoxic cell swelling. *J. Neurosci.* 36, 11881–11890.

Douglas, H.A., Callaway, J.K., Sword, J., Kirov, S.A., and Andrew, R.D. (2011). Potent inhibition of anoxic depolarization by the sodium channel blocker dibucaine. *J. Neurophysiol.* 105, 1482–1494.

Downie, D.L., Hall, A.C., Lieb, W.R., and Franks, N.P. (1996). Effects of inhalational general

- anaesthetics on native glycine receptors in rat medullary neurones and recombinant glycine receptors in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 118, 493–502.
- Dreier, J.P., Major, S., Foreman, B., Winkler, M.K.L., Kang, E.J., Milakara, D., Lemale, C.L., DiNapoli, V., Hinzman, J.M., Woitzik, J., et coll. (2018). Terminal spreading depolarization and electrical silence in death of human cerebral cortex. *Ann. Neurol.* 83, 295–310.
- Dzhala, V., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2001). Neuronal mechanisms of the anoxia-induced network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 536, 521–531.
- Eckle, V.S., DiGrucio, M.R., Uebele, V.N., Renger, J.J., and Todorovic, S.M. (2012). Inhibition of T-type calcium current in rat thalamocortical neurons by isoflurane. *Neuropharmacology* 63, 266–273.
- Eger, E., Stevens, W., and Cromwell, T. (1971). The Electroencephalogram in Man Anesthetized with Forane. *Anesthesiology* 35, 504–508.
- Ekholm, A., Katsura, K.-I., and Siesjo, B. (1993). Coupling of Energy Failure and Dissipative K⁺ flux during ischemia: role of preischemic plasma glucose concentration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 193–200.
- Eklof, B., Lassen, N.A., Nilsson, L., Norberg, K., and Siesjö, B.K. (1973). Blood Flow and Metabolic Rate for Oxygen in the Cerebral Cortex of the Rat. *Acta Physiol. Scand.* 88, 587–589.
- El-Beheiry, H., and Puil, E. (1989a). Anaesthetic depression of excitatory synaptic transmission in neocortex. *Exp. Brain Res.* 77, 87–93.
- El-Beheiry, H., and Puil, E. (1989b). Postsynaptic depression induced by isoflurane and althesin in neocortical neurons. *Exp. Brain Res.* 75, 361–368.
- Erecinska, M., Thoresen, M., and Silver, I.A. (2003). Effects of hypothermia on energy metabolism in mammalian central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 513–530.
- Farkas, E., Pratt, R., Sengpiel, F., and Obrenovitch, T.P. (2008). Direct, live imaging of cortical spreading depression and anoxic depolarisation using a fluorescent, voltage-sensitive dye. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 251–262.

- Featherstone, H.W. (1947). Chloroform. In *The American Society of Anesthesiologists*, pp. 362–371.
- Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front. Neuroanat.* 6, 1–22.
- Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C.C.H., Poulet, J.F.A., Staiger, J.F., Luhmann, H.J., and Schwarz, C. (2013). Barrel cortex function. *Prog. Neurobiol.* 103, 3–27.
- Fenster, J.M. (2001). *Ether day: The strange tale of America's greatest medical discovery and the haunted men who made it.*
- Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L.J., Aronoff, R., Weber, B., and Petersen, C.C.H. (2007). Spatiotemporal Dynamics of Cortical Sensorimotor Integration in Behaving Mice. *Neuron* 56, 907–923.
- Ferron, J.-F., Kroeger, D., Chever, O., and Amzica, F. (2009). Cortical Inhibition during Burst Suppression Induced with Isoflurane Anesthesia. *J. Neurosci.*
- Finelli, L.A., Baumann, H., Borbély, A.A., and Achermann, P. (2000). Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: Correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep. *Neuroscience* 101, 523–529.
- Fitzpatrick, W., and Lowry, N. (2007). PLEDs: Clinical correlates. *Can. J. Neurol. Sci.* 34, 443–450.
- Flint, C., and Connors, W. (1996). Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 75, 951–956.
- Foreman, B., and Claassen, J. (2012). Quantitative EEG for the detection of brain ischemia. *Crit. Care* 16.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1988). Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature* 333, 662–664.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367, 607–614.

- Frässle, S., Sommer, J., Jansen, A., Naber, M., and Einhäuser, W. (2014). Binocular rivalry: Frontal activity relates to introspection and action but not to perception. *J. Neurosci.* *34*, 1738–1747.
- Freeman, W.J., and van Dijk, B.W. (1987). Spatial patterns of visual cortical fast EEG during conditioned reflex in a rhesus monkey. *Brain Res.* *422*, 267–276.
- Freygang, W.H., and Landau, W.M. (1955). Some relations between resistivity and electrical activity in the cerebral cortex of the cat. *J. Cell. Comp. Physiol.* *45*, 377–392.
- Fries, P. (2009). Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 209–224.
- Fries, P., Reynolds, J.H., Rorie, A.E., and Desimone, R. (2001). Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* (80-.). *291*, 1560–1563.
- Frietsch, T., Krafft, P., Piegras, A., Lenz, C., Kuschinsky, W., and Waschke, K.F. (2000). Relationship between local cerebral blood flow and metabolism during mild and moderate hypothermia in rats. *Anesthesiology* *92*, 754–763.
- Fujimura, N., Tanaka, E., Yamamoto, S., Shigemori, M., and Higashi, H. (1997). Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* *77*, 378–385.
- Geddes, L.A. (1987). What did Caton see? *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *67*, 2–6.
- Geisler, C.D., and Gerstein, G.L. (1961). The surface EEG in relation to its sources. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *13*, 927–934.
- Gelman, M.L., and Lichtenstein, N.S. (1981). Halothane-induced nephrotoxicity. *Urology* *17*, 323–327.
- Gent, T.C., Bandarabadi, M., Herrera, C.G., and Adamantidis, A.R. (2018). Thalamic dual control of sleep and wakefulness. *Nat. Neurosci.* *21*.
- Gervitz, L.M., Lutherer, L.O., Davies, D.G., Pirch, J.H., and Fowler, J.C. (2001). Adenosine induces initial hypoxic-ischemic depression of synaptic transmission in the rat hippocampus in vivo. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *280*, 639–645.

- Girard, P., Salin, P.A., and Bullier, J. (1991). Visual activity in areas V3a and V3 during reversible inactivation of area V1 in the macaque monkey. *J. Neurophysiol.* *66*, 1493–1503.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugaro, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat. Neurosci.* *12*, 1222–1223.
- Girton, D.G., Benson, K.L., and Kamiya, J.O.E. (1973). Observation of very slow potential oscillations in human scalp recordings. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *35*, 561–568.
- Gloor, P., Kalabay, O., and Giard, N. (1968). The electroencephalogram in diffuse encephalopathies: Electroencephalographic correlates of grey and white matter lesions. *Brain* *91*, 779–802.
- Goldin, M.A., and Mindlin, G.B. (2017). Temperature manipulation of neuronal dynamics in a forebrain motor control nucleus. *PLoS Comput. Biol.* *13*, e1005699.
- Gray, C.M., Konig, P., Engel, A.K., and Singer, W. (1989). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* *338*, 334–337.
- Greyson, B. (2003). Incidence and correlates of near-death experiences in a cardiac care unit. *Gen. Hosp. Psychiatry* *25*, 269–276.
- Guterman, B., Sebastian, P., and Sodha, N. (1981). Recovery from Alpha Coma after Lorazepam Overdose. *Clin. EEG Neurosci.* *12*, 205–208.
- Gyulai, F.E., Mintun, M.A., and Firestone, L.L. (2001). Dose-dependent enhancement of in vivo GABAA-benzodiazepine receptor binding by isoflurane. *Anesthesiology* *95*, 585–593.
- Hansen, A.J. (1978). The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol. Scand.* *102*, 324–329.
- Hansen, A.J. (1985). Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* *65*, 101–148.
- Hansen, A.J., Hounsgaard, J., and Jahnsen, H. (1982). Anoxia increases potassium conductance in hippocampal nerve cells. *Acta Physiol. Scand.* *115*, 301–310.
- Harding, E.C., Franks, N.P., and Wisden, W. (2019). The temperature dependence of sleep.

Front. Neurosci. *13*, 1–16.

Hardingham, N.R., and Larkman, A.U. (1998). The reliability of excitatory synaptic transmission in slices of rat visual cortex in vitro is temperature dependent. *J. Physiol.* *507*, 249–256.

Harris, K.D., and Mrsic-Flogel, T.D. (2013). Cortical connectivity and sensory coding. *Nature* *503*, 51–58.

Harris, K.D., and Thiele, A. (2011). Cortical state and attention. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 509–523.

Harris, R.A., Mihic, J.S., Dildy-Mayfield, J.E., and Machu, T.K. (1995). Actions of anesthetics on ligand-gated ion channels: role of receptor subunit composition. *FASEB J.* *9*, 1454–1462.

Harrison, N.L., Kugler, J.L., Jones, M. V., Greenblatt, E.P., and Pritchett, D.B. (1993). Positive modulation of human γ -aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol. Pharmacol.* *44*, 628–632.

Heiss, W., and Rosner, G. (1983). Functional Recovery of Cortical Neurons as Related to Degree and Duration of Ischemia. *91*.

Henriksen, E.J. (2002). Invited Review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 788–796.

Henry, C., and Scoville, W.B. (1952). Suppression-burst activity from isolated cerebral cortex in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *4*, 1–22.

Herold, K.F., and Hemmings, H.C. (2012). Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Front. Pharmacol.* *3 MAR*, 1–7.

Hofle, N., Paus, T., Reutens, D., Fiset, P., Gotman, J., Evans, A.C., and Jones, B.E. (1997). Regional cerebral blood flow changes as a function of delta and spindle activity during slow wave sleep in humans. *J. Neurosci.* *17*, 4800–4808.

Hofmeijer, J., and van Putten, M.J.A.M. (2016). EEG in postanoxic coma: Prognostic and diagnostic value. *Clin. Neurophysiol.* *127*, 2047–2055.

- Hölscher, C., Anwyl, R., and Rowan, M.J. (1997). Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J. Neurosci.* 17, 6470–6477.
- Holt, G.R., Softky, W.R., Koch, C., and Douglas, R.J. (1996). Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons. *J. Neurophysiol.* 75, 1806–1814.
- Hong, G., and Lieber, C.M. (2019). Novel electrode technologies for neural recordings. *Nat. Rev. Neurosci.*
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 251–261.
- Hornbein, T.F., and Sorensen, S.C. (1972). d-c Potential difference between different cerebrospinal fluid sites and blood in dogs. *Am. J. Physiol.* 223, 415–418.
- Hossmann, K.A. (1971). Cortical Changes Steady During Potential , and After Impedance Total and Excitability of Cat. *Exp. Neurol.* 32, 163–175.
- Hossmann, K.A., and Kleihues, P. (1973). Reversibility of Ischemic Brain Damage. *Arch. Neurol.* 29, 375–384.
- Hou, Y., Huang, Q., Prakash, R., and Chaudhury, S. (2013). Infrequent near death experiences in severe brain injury survivors - A quantitative and qualitative study. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 16, 75–81.
- Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., and Tononi, G. (2004). Local sleep and learning. *Nature* 430, 78–81.
- Hughes, J.R. (1980). Correlations between EEG and chemical changes in uremia. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 48, 583–594.
- Hughes, J.R., Boshes, B., and Leestma, J. (1976). Electro-clinical and pathologic correlations in comatose patients. *Clin. Enceph.* 7, 14–30.
- Husain, A.M. (2006). Electroencephalographic assessment of coma. In *Journal of Clinical Neurophysiology*, p.
- Illievich, U.M., Petricek, W., Schramm, W., Weindlmayr-goettel, M., Czech, T., and Spiss,

- C.K. (1993). Electroencephalographic Burst Suppression by propofol infusion in humans: hemodynamic consequences. *Anesth. Analg.* *77*, 155–160.
- Inoue, M., Ates, N., Vossen, J.M.H., and Coenen, A.M.L. (1994). Effects of the neuroleptanalgesic fentanyl-fluanisone (Hypnorm) on spike-wave discharges in epileptic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *48*, 547–551.
- Jacobs, J., Kahana, M.J., Ekstrom, A.D., and Fried, I. (2007). Brain oscillations control timing of single-neuron activity in humans. *J. Neurosci.* *27*, 3839–3844.
- James, M.L., Andersen, N.D., Swaminathan, M., Phillips-Bute, B., Hanna, J.M., Smigla, G.R., Barfield, M.E., Bhattacharya, S.D., Williams, J.B., Gaca, J.G., et coll. (2014). Predictors of electrocerebral inactivity with deep hypothermia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *147*, 1002–1007.
- Jarvis, C.R., Anderson, T.R., and Andrew, R.D. (2001). Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices. *Cereb. Cortex* *11*, 249–259.
- Jenkins, A., Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1996). Actions of general anaesthetics on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* *117*, 1507–1515.
- Jia, X., Koenig, M.A., Shin, H.C., Zhen, G., Yamashita, S., Thakor, N. V., and Geocadin, R.G. (2006). Quantitative EEG and neurological recovery with therapeutic hypothermia after asphyxial cardiac arrest in rats. *Brain Res.* *1111*, 166–175.
- Jia, X., Koenig, M.A., Shin, H.C., Zhen, G., Thakor, N. V., and Geocadin, R.G. (2007). Improving neurological outcomes post-cardiac arrest in a rat model: immediate hypothermia and quantitative EEG monitoring. *J. Resusc.* *25*, 713–724.
- Jiang, C., and Haddad, G.G. (1997). Modulation of K⁺ channels by intracellular ATP in human neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* *77*, 93–102.
- Jones, M. V., and Harrison, N.L. (1993). Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* *70*, 1339–1349.
- Jones, M.W., and Wilson, M.A. (2005). Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol.* *3*, 1–13.

- Joo, P., Lee, H., Wang, S., Kim, S., and Hudetz, A.G. (2021). Network Model With Reduced Metabolic Rate Predicts Spatial Synchrony of Neuronal Activity. *Front. Comput. Neurosci.* *15*, 1–12.
- Juzekaeva, E., Nasretidinov, A., Gainutdinov, A., Sintsov, M., Mukhtarov, M., and Khazipov, R. (2017). Preferential initiation and spread of anoxic depolarization in layer 4 of rat barrel cortex. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 1–11.
- Kahana, M.J., Sekuler, R., Caplan, J.B., Kirschen, M., and Madsen, J.R. (1999). Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. *Nature* *399*, 781–784.
- Kahana, M.J., Seelig, D., and Madsen, J.R. (2001). Theta returns. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 739–744.
- Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovács, R., Wirtz, S., and Schuelke, M. (2011). Gamma oscillations in the hippocampus require high complex i gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* *134*, 345–358.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 511–535.
- Kaplan, P.W. (2004). The EEG in metabolic encephalopathy and coma. *J. Clin. Neurophysiol.* *21*, 307–318.
- Kaplan, P.W., Genoud, D., Ho, T.W., and Jallon, P. (1999). Etiology, neurologic correlations, and prognosis in alpha coma. *Clin. Neurophysiol.* *110*, 205–213.
- Katchman, A.N., and Hershkowitz, N. (1993). Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.* *70*, 1–7.
- Kaufmann, D., Theriot, J.J., Zyuzin, J., Service, C.A., Chang, J.C., Tang, Y.T., Bogdanov, V.B., Multon, S., Schoenen, J., Ju, Y.S., et coll. (2017). Heterogeneous incidence and propagation of spreading depolarizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *37*, 1748–1762.
- Kawai, K., Nitecka, L., Ruetzler, C.A., Nagashima, G., Joo, F., Mies, G., Nowak, T.S., Saito, N., Lohr, J.M., and Klatzo, I. (1992). Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *12*, 238–249.

Khazipov, R., Congar, P., and Ben-Ari, Y. (1995). Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: Comparison of effects of anoxia on excitatory and inhibitory postsynaptic currents. *J. Neurophysiol.* *74*, 2138–2149.

Kiefer, R.T., Rohr, P., Ploppa, A., Dieterich, H.J., Grothusen, J., Koffler, S., Altemeyer, K.H., Unertl, K., and Schwartzman, R.J. (2008). Efficacy of ketamine in anesthetic dosage for the treatment of refractory complex regional pain syndrome: An open-label phase II study. *Pain Med.* *9*, 1173–1201.

Kiley, J.P., Eldridge, F.L., and Millhorn, D.E. (1984). Brain, blood and rectal temperature during whole body cooling. *Comp. Biochem. Physiol.* *79A*, 631–634.

Kim, S.J., and Linden, D.J. (2007). Ubiquitous Plasticity and Memory Storage. *Neuron*.

Kirshbaum, R.J., and Carollo, V.J. (1970). Reversible Iso-electric EEG In Barbiturate Coma. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *212*, 1215.

Kishikawa, J. ichi, Inoue, Y., Fujikawa, M., Nishimura, K., Nakanishi, A., Tanabe, T., Imamura, H., and Yokoyama, K. (2018). General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels. *PLoS One* *13*, 1–12.

Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science (80-.)*. *321*, 53–57.

Klee, M.R., Pierau, F.K., and Faber, D.S. (1974). Temperature effects on resting potential and spike parameters of cat motoneurons. *Exp. Brain Res.* *19*, 478–492.

Kocsis, J.D., Malenka, R.C., and Waxman, S.G. (1983). Effects of extracellular potassium concentration on the excitability of the parallel fibres of the rat cerebellum. *J. Physiol.* *334*, 225–244.

Kofuji, P., and Newman, E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* *129*, 1043–1054.

Kongara, K., McIlhone, A.E., Kells, N.J., and Johnson, C.B. (2014). Electroencephalographic evaluation of decapitation of the anaesthetized rat. *Lab. Anim.* *48*, 15–19.

Kostyuk, P.G. (1984). Metabolic control of ionic channels in the neuronal membrane.

Neuroscience *13*, 983–989.

Krafft, P., Frietsch, T., Lenz, C., Piepgras, A., Kuschinsky, W., and Waschke, K.F. (2000). Mild and moderate hypothermia (α -stat) do not impair the coupling between local cerebral blood flow and metabolism in rats. *Stroke* *31*, 1393–1401.

Krasowski, M.D., and Harrison, N.L. (1999). General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 1278–1303.

Kroeger, D., and Amzica, F. (2007). Hypersensitivity of the Anesthesia-Induced Comatose Brain. *J. Neurosci.* *27*, 10597–10607.

Kroeger, D., Florea, B., and Amzica, F. (2013). Human Brain Activity Patterns beyond the Isoelectric Line of Extreme Deep Coma. *PLoS One*.

Kuroiwa, Y., and Celesia, G. (1980). Clinical significance of periodic EEG patterns. *Arch Neurol.* *37*, 15–20.

de la Paz, D., and Brenner, R.P. (1981). Bilateral independent periodic lateralized epileptiform discharges: Clinical significance. *Arch. Neurol.* *38*, 713–715.

Largo, C., Ibarz, J.M., and Herreras, O. (1997). Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J. Neurophysiol.* *78*, 295–307.

Larsen, M., Hegstad, E., Berg-Johnsen, J., and Langmoen, I.A. (1997). Isoflurane increases the uptake of glutamate in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Br. J. Anaesth.* *78*, 55–59.

Laureys, S. (2005). Science and society: Death, unconsciousness and the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*

Leao, A.A.P. (1944). Spreading Depression of Activity in the Cerebral Cortex. *J. Neurophysiol.* *7*, 359–390.

Leao, A.A.P. (1947). Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* *10*, 409–414.

Lee, S.H., and Dan, Y. (2012). Neuromodulation of Brain States. *Neuron* *76*, 209–222.

- Lee, D.E., Lee, L.G., Siu, D., Bazrafkan, A.K., Farahabadi, M.H., Dinh, T.J., Orellana, J., Xiong, W., Lopour, B.A., and Akbari, Y. (2017). Neural Correlates of Consciousness at Near-Electrocerebral Silence in an Asphyxial Cardiac Arrest Model. *Brain Connect.* 7, 172–181.
- Leresche, N., Lightowler, S., Soltesz, I., Jassik-Gerschenfeld, D., and Crunelli, V. (1991). Low-frequency oscillatory activities intrinsic to rat and cat thalamocortical cells. *J. Physiol.* 441, 155–174.
- Leung, L.S. (1998). Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 275–290.
- Levin, E.D., Uemura, E., and Bowman, R.E. (1991). Neurobehavioral toxicology of halothane in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 461–470.
- Lin, L.-H., Chan, L., and Harris, A. (1993). Enflurane inhibits NMDA, AMPA and kainate-induced currents in *Xenopus* oocytes expressing mouse and human brain mRNA. *FASEB J.* 7, 479–485.
- Lipton, P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431–1568.
- Llinas, R.R., Grace, A.A., and Yarom, Y. (1991). In vitro neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-Hz frequency range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 897–901.
- Lomber, S.G., Payne, B.R., and Cornwell, P. (1996). Learning and recall of form discriminations during reversible cooling deactivation of ventral-posterior suprasylvian cortex in the cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1654–1658.
- Van Lommel, P., Van Wees, R., Meyers, V., and Elfferich, I. (2001). Near-death experience in survivors of cardiac arrest: A prospective study in the Netherlands. *Lancet* 358, 2039–2045.
- Lopes da Silva, F.H., Vos, J.E., Mooibroek, J., and van Rotterdam, A. (1980). Relative contributions of intracortical and thalamo-cortical processes in the generation of alpha rhythms, revealed by partial coherence analysis. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 50, 449–456.
- Lopes Da Silva, F.H., and Storm Van Leeuwen, W. (1977). The cortical source of the alpha rhythm. *Neurosci. Lett.* 6, 237–241.

Lückl, J., Lemale, C.L., Kola, V., Horst, V., Khojasteh, U., Oliveira-Ferreira, A.I., Major, S., Winkler, M.K.L., Kang, E.J., Schoknecht, K., et coll. (2018). The negative ultraslow potential, electrophysiological correlate of infarction in the human cortex. *Brain* *141*, 1734–1752.

Lukatch, H.S., Kiddoo, C.E., and MacIver, M.B. (2005). Anesthetic-induced burst suppression EEG activity requires glutamate-mediated excitatory synaptic transmission. *Cereb. Cortex* *15*, 1322–1331.

MacIver, M.B., and Bland, B.H. (2014). Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. *Front. Syst. Neurosci.* *8*, 1–8.

MacIver, M.B., Tanelian, D.L., and Mody, I. (1991). Two mechanisms for anesthetic-induced enhancement of GABA_A-mediated neuronal inhibition. *Ann. New York Acad. Sci.* *625*, 91–96.

MacIver, M.B., Mikulec, A., Amagasa, S., and Monroe, F. (1996). Volatile Anesthetics Depress Glutamate Transmission Via Presynaptic Actions. *Anesthesiology* *85*, 823–834.

Madl, J.E., and Royer, S.M. (2000). Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxic and hypoglycemic rat hippocampal slices. *Neuroscience* *96*, 657–664.

Mahon, S., and Charpier, S. (2012). Bidirectional Plasticity of Intrinsic Excitability Controls Sensory Inputs Efficiency in Layer 5 Barrel Cortex Neurons in Vivo. *J. Neurosci.* *32*, 11377–11389.

Mahon, S., Deniau, J.-M., and Charpier, S. (2001). Relationship between EEG Potentials and Intracellular Activity of Striatal and Cortico-striatal Neurons: an In Vivo Study under Different Anesthetics. *Cereb. Cortex* *11*, 360–373.

Mahon, S., Vautrelle, N., Pezard, L., Slaght, S.J., Deniau, J.-M., Chauvet, G., and Charpier, S. (2006). Distinct Patterns of Striatal Medium Spiny Neuron Activity during the Natural Sleep-Wake Cycle. *J. Neurosci.* *26*, 12587–12595.

Maingret, N., Girardeau, G., Todorova, R., Goutierre, M., and Zugaro, M. (2016). Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* *19*, 959–964.

- Markram, H. (1997). A network of tufted layer 5 pyramidal neurons. *Cereb. Cortex* 7, 523–533.
- Markram, H., Lu, J., Frotscher, M., and Sakmann, B. (1997). Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. *275*, 1–3.
- Marmor, M.F. (1971). The effect of temperature and ions on the current-voltage relation and electrical characteristics of a molluscan neurone. *J. Physiol.* 2018, 573–598.
- Martial, C., Cassol, H., Charland-Verville, V., Pallavicini, C., Sanz, C., Zamberlan, F., Vivot, R.M., Erowid, F., Erowid, E., Laureys, S., et coll. (2019). Neurochemical models of near-death experiences: A large-scale study based on the semantic similarity of written reports. *Conscious. Cogn.* 69, 52–69.
- Massabuau, J.C., and Meyrand, P. (1996). Modulation of a neural network by physiological levels of oxygen in lobster stomatogastric ganglion. *J. Neurosci.* 16, 3950–3959.
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S., and Tononi, G. (2004). The sleep slow oscillation as a traveling wave. *J. Neurosci.* 24, 6862–6870.
- Mathers, D.A., Wan, X., and Puil, E. (2007). Barbiturate activation and modulation of GABAA receptors in neocortex. *Neuropharmacology* 52, 1160–1168.
- Matory, A.L., Alkhachroum, A., Chiu, W.T., Eliseyev, A., Doyle, K., Rohaut, B., Eggebike, J.A., Velazquez, A.G., Der-Nigoghossian, C., Paniker, L., et coll. (2021). Electrocerebral Signature of Cardiac Death. *Neurocrit. Care* 35, 853–861.
- McCormick, D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol.* 39, 337–388.
- McCormick, D.A., and Pape, H.-C. (1990). Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431, 319–342.
- Merkel, G., and Eger, E.I. (1963). A comparative study of halothane and halopropane anesthesia. *Anesthesiology* 24, 346–357.
- Meyer, F.B. (1989). Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res. Rev.*

14, 227–243.

Meyer, R.A., and Allen, G.D. (1967). Halothane in outpatient dental anesthesia. *Anesthesiology* 24, 760–775.

Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Hemberger, M., Bruno, R.M., De Kock, C.P.J., Frick, A., Sakmann, B., and Helmstaedter, M. (2010). Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex* 20, 2287–2303.

Michalski, B.Y.A., Wimborne, B.M., and Henry, G.H. (1993). The effect of reversible cooling of cat's primary visual cortex on the responses of area 21a neurons. *J. Physiol.* 466, 133–156.

Michenfelder, J.D., and Milde, J.H. (1991). The relationship among canine brain temperature, metabolism, and function during hypothermia. *Anesthesiology* 75, 130–136.

Mihic, J.S., Ye, Q., Wick, M.J., Koltchine, V. V., Krasowski, M.D., Finn, S.E., Mascia, M.P., Fernando Valenzuela, C., Hanson, K.K., Greenblatt, E.P., et coll. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389, 385–389.

Minami, K., Vanderah, T.W., Minami, M., and Harris, R.A. (1997). Inhibitory effects of anesthetics and ethanol on muscarinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 339, 237–244.

La Monaca, E., and Fodale, V. (2012). Effects of Anesthetics on Mitochondrial Signaling and Function. *Curr. Drug Saf.* 7, 126–139.

Monto, S., Palva, S., Voipio, J., and Palva, J.M. (2008). Very slow EEG fluctuations predict the dynamics of stimulus detection and oscillation amplitudes in humans. *J. Neurosci.* 28, 8268–8272.

Morison, R.S., and Basset, D.L. (1945). Electrical activity of the thalamus and basal ganglia in decorticate cats. *J. Neurophysiol.* 8, 309–314.

Morse, M.L., and Neppe, V. (1991). Near-death experiences: response. *Lancet* 337, 858.

Mortazavi, S., Thompson, J., Baghdoyen, H.A., and Lydic, R. (1999). Fentanyl and morphine, but not remifentanyl, inhibit acetylcholine release in pontine regions modulating arousal.

Anesthesiology 90, 1070–1077.

Moruzzi, G., and Magoun, H.W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1, 445–473.

Moser, E., Mathiesen, I., and Andersen, P. (1993). Association Between Brain Temperature and Dentate Field Potentials in Exploring and Swimming Rats. *Science* (80-.). 259.

Moulton, R.J., Brown, J.I.M., and Konasiewicz, S.J. (1998). Monitoring severe head injury: A comparison of EEG and somatosensory evoked potentials. *Can. J. Neurol. Sci.* 25.

Müller, M., and Somjen, G.G. (1998). Inhibition of major cationic inward currents prevents spreading depression-like hypoxic depolarization in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res.* 812, 1–13.

Muroi, Y., Theusch, C.M., Czajkowski, C., and Jackson, M.B. (2009). Distinct structural changes in the GABA_A receptor elicited by pentobarbital and GABA. *Biophys. J.* 96, 499–509.

Murthy, V.N., and Fetz, E.E. (1992). Coherent 25- To 35-Hz oscillations in the sensorimotor cortex of awake behaving monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5670–5674.

Nagata, K., Tagawa, K., Hiroi, S., Shishido, F., and Uemura, K. (1989). Electroencephalographic correlates of blood flow and oxygen metabolism provided by positron emission tomography in patients with cerebral infarction. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 72, 16–30.

Nakashima, K., Todd, M.M., and Warner, S.D. (1995). The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarization: a comparison of effects of hypothermia, pentobarbital and isoflurane. *Anesthesiology* 82, 1199–1208.

Nasretdinov, A., Lotfullina, N., Vinokurova, D., Lebedeva, J., Burkhanova, G., Chernova, K., Zakharov, A., and Khazipov, R. (2017). Direct current coupled recordings of cortical spreading depression using silicone probes. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1–11.

Neuman, M.R. (2010). Biopotential electrodes. In *Medical Instrumentation: Application and Design, Fourth Edition.*, pp. 233–261.

- Newberg, L.A., Milde, J.H., and Michenfelder, J.D. (1983). The Cerebral Metabolic Effects of Isoflurane at and above Concentrations that Suppress Cortical Electrical Activity. *Anesthesiology* 59, 23–28.
- Niedermeyer, E., Sherman, D.L., Geocadin, R., Hansen, C., and Hanley, D.F. (1999). The burst-suppression electroencephalogram. *Clin. Enceph.* 30, 99–105.
- Nishida, M., and Walker, M.P. (2007). Daytime naps, motor memory consolidation and regionally specific sleep spindles. *PLoS One* 2.
- Nita, D.A., Vanhatalo, S., Lafortune, F.D., Voipio, J., Kaila, K., and Amzica, F. (2004). Nonneuronal origin of CO₂-related DC EEG shifts: An in vivo study in the cat. *J. Neurophysiol.* 92, 1011–1022.
- Nolte, M., Reimann, M.W., King, J.G., Markram, H., and Muller, E.B. (2019). Cortical reliability amid noise and chaos. *Nat. Commun.* 10.
- Nuñez, A., Amzica, F., and Steriade, M. (1992). Voltage-dependent fast (20-40 Hz) oscillations in long-axoned neocortical neurons. *Neuroscience* 51, 7–10.
- O’Hare, J.A., Callaghan, N.M., and Murnaghan, D.J. (1983). Dialysis encephalopathy: clinical electroencephalography and interventional aspects. *Medicine (Baltimore)*. 62.
- O’Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*.
- O’Keefe, J., and Recce, M.L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3, 317–330.
- Obrenovitch, T.P., and Zilkha, E. (1995). High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression. *J. Neurophysiol.* 73, 2107–2114.
- Obrenovitch, T.P., Zilkha, E., and Urenjak, J. (1995). Intracerebral microdialysis: Electrophysiological evidence of a critical pitfall. *J. Neurochem.* 64, 1884–1887.
- Olthoff, D., and Rohrbach, A. (1998). Sevofluran in der geburtshilflichen anesthesie. *Anaesthesist* 47, 63–69.
- Oostenveld, R., Fries, P., Maris, E., and Schoffelen, J.M. (2011). *FieldTrip: Open source*

software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput. Intell. Neurosci.* 2011.

Orestes, P., and Todorovic, S.M. (2010). Are neuronal voltage-gated calcium channels valid cellular targets for general anesthetics? *Channels* 4, 518–522.

Pape, H.-C. (1996). Queer Current and Pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 299–327.

Paré, D., Shink, E., Gaudreau, H., Destexhe, A., and Lang, E.J. (1998). Impact of Spontaneous Synaptic Activity on the Resting Properties of Cat Neocortical Pyramidal Neurons In Vivo. *J. Neurophysiol.* 79, 1450–1460.

Parvizi, J., and Damasio, A.R. (2003). Neuroanatomical correlates of brainstem coma. *Brain* 126, 1524–1536.

Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* 2, 422–426.

Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in STereotaxic Coordinates* 6th Edition (Academic Press).

Pedata, F., Latini, S., Pugliese, A.M., and Pepeu, G. (1993). Investigations into the Adenosine Outflow from Hippocampal Slices Evoked by Ischemia-Like Conditions. *J. Neurochem.* 61, 284–289.

Peinkhofer, C., Dreier, J.P., and Kondziella, D. (2019). Semiology and Mechanisms of Near-Death Experiences. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 19.

Penttonen, M., and Buzsáki, G. (2003). Natural logarithmic relationship between brain oscillators. *Thalamus Relat. Syst.* 2, 145.

Penttonen, M., Nurminen, N., Miettinen, R., Sirviö, J., Henze, D.A., Csicsvári, J., and Buzsáki, G. (1999). Ultra-slow oscillation (0.025 Hz) triggers hippocampal afterdischarges in Wistar rats. *Neuroscience* 94, 735–743.

Perouansky, M., Baranov, D., Salman, M., and Yaari, Y. (1995). Effects of halothane on

glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents: a patch-clamp study in adult mouse hippocampal slices. *Anesthesiology* 83, 109–119.

Petersen, C.C.H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339–355.

Petersen, C.C.H., and Crochet, S. (2013). Synaptic Computation and Sensory Processing in Neocortical Layer 2/3. *Neuron* 78, 28–48.

Pietrobon, D., and Moskowitz, M.A. (2014). Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 379–393.

Pivovarov, A.S., Calahorra, F., and Walker, R.J. (2019). Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebr. Neurosci.* 19, 1–16.

Poulet, J.F.A., and Crochet, S. (2019). The Cortical States of Wakefulness. *Front. Syst. Neurosci.* 12, 1–18.

Poulet, J.F.A., Fernandez, L.M.J., Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2012). Thalamic control of cortical states. *Nat. Neurosci.* 15, 370–372.

Prosser, L.C., and Buehl, C.C. (1939). Oxidative control of “spontaneous” activity in the nervous system of the crayfish. *J. Cell. Physiol.* 4, 287–297.

Purdon, P.L., Sampson, A., Pavone, K.J., and Brown, E.N. (2015). Clinical Electroencephalography for Anesthesiologists: Part I: Background and Basic Signatures. *Anesthesiology* 123, 937–960.

Raj, A.B.M., Wotton, S.B., and Gregory, N.G. (1992). Changes in the somatosensory evoked potentials and spontaneous electroencephalogram of hens during stunning with a carbon dioxide and argon mixture. *Br. Vet. J.* 148, 147–156.

Rampil, I., Lockhart, S., Eger, E., Yasuda, N., Weiskopf, R., and Cahalan, M. (1991). The electroencephalographic effects of desflurane in humans. *Anesthesiology* 74, 434–439.

Reid, C.A., Bekkers, J.M., and Clements, J.D. (2003). Presynaptic Ca²⁺ channels: A functional patchwork. *Trends Neurosci.* 26, 683–687.

Reilly, E.L. (1989). Temperature effects on the electroencephalogram. *Am. J. EEG Technol.*

29, 275–281.

Reinagel, P. (2000). Information theory in the brain. *Curr. Biol.* *10*, 542–544.

Renzel, R., Baumann, C.R., Mothersill, I., and Poryazova, R. (2017). Persistent generalized periodic discharges: A specific marker of fatal outcome in cerebral hypoxia. *Clin. Neurophysiol.* *128*, 147–152.

Revah, O., Lasser-Katz, E., Fleidervish, I.A., and Gutnick, M.J. (2016). The earliest neuronal responses to hypoxia in the neocortical circuit are glutamate-dependent. *Neurobiol. Dis.* *95*, 158–167.

Richards, C.D. (2002). Anaesthetic modulation of synaptic transmission in the mammalian CNS. *Br. J. Anaesth.* *89*, 79–90.

Ries, C.R., and Puil, E. (1993). Isoflurane prevents transitions to tonic and burst firing modes in thalamic neurons. *Neurosci. Lett.* *159*, 91–94.

Ries, C.R., and Puil, E. (1999a). Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons. *J. Neurophysiol.* *81*, 1795–1801.

Ries, C.R., and Puil, E. (1999b). Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. *J. Neurophysiol.* *81*, 1802–1809.

Rihs, T.A., Michel, C.M., and Thut, G. (2007). Mechanisms of selective inhibition in visual spatial attention are indexed by α -band EEG synchronization. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 603–610.

Rihs, T.A., Michel, C.M., and Thut, G. (2009). A bias for posterior α -band power suppression versus enhancement during shifting versus maintenance of spatial attention. *Neuroimage* *44*, 190–199.

van Rijn, C.M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S., and Coenen, A.M.L. (2011).

Decapitation in rats: Latency to unconsciousness and the “wave of death.” *PLoS One* *6*, 1–6.

Ritter, A.M., Muizelaar, P.J., Barnes, T., Choi, S., Fatouros, P., Ward, J., and Bullock, R.M. (1999). Brain stem blood flow, pupillary response and outcome in patients with severe head injuries. *Neurosurgery* *44*, 941–948.

Rolfe, D.F.S., and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of

standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731–758.

Roopun, A.K., Middleton, S.J., Cunningham, M.O., LeBeau, F.E.H., Bibbig, A., Whittington, M.A., and Traub, R.D. (2006). A beta2-frequency (20-30 Hz) oscillation in nonsynaptic networks of somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15646–15650.

Rosen, A.S., and Morris, M.E. (1993). Anoxic depression of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical slices. *J. Neurophysiol.* 69, 109–117.

Rudolph, U., and Antkowiak, B. (2004). Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 709–720.

Rudolph, M., Pelletier, J.G., Paré, D., and Destexhe, A. (2005). Characterization of synaptic conductances and integrative properties during electrically induced EEG-activated states in neocortical neurons in vivo. *J. Neurophysiol.* 94, 2805–2821.

Rudolph, M., Pospischil, M., Timofeev, I., and Destexhe, A. (2007). Inhibition determines membrane potential dynamics and controls action potential generation in awake and sleeping cat cortex. *J. Neurosci.* 27, 5280–5290.

Rudy, B., Fishell, G., Lee, S.H., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61.

Sanchez-Vives, M. V., and McCormick, D.A. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.* 3, 1027–1034.

Sasaki, R., Hirota, K., Roth, S.H., and Yamazaki, M. (2005). Anoxic depolarization of rat hippocampal slices is prevented by thiopental but not by propofol or isoflurane. *Br. J. Anaesth.* 94, 486–491.

Schramm, A.E., Carton-Leclercq, A., Diallo, S., Navarro, V., Chavez, M., Mahon, S., and Charpier, S. (2020). Identifying neuronal correlates of dying and resuscitation in a model of reversible brain anoxia. *Prog. Neurobiol.* 9–10.

Scollo-Lavizzari, G., and Bassetti, C. (1987). Prognostic value of EEG in post-anoxic coma after cardiac arrest. *Eur. Neurol.* 26, 161–170.

Seidel, J.L., and Shuttleworth, C.W. (2011). Contribution of astrocyte glycogen stores to

progression of spreading depression and related events in hippocampal slices. *Neuroscience* 192, 295–303.

Sejnowski, T.J., and Destexhe, A. (2000). Why do we sleep? *Brain Res.* 886, 208–223.

Shannon, C.E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 623–656.

Shen, K. fei, and Schwartzkroin, P.A. (1988). Effects of temperature alterations on population and cellular activities in hippocampal slices from mature and immature rabbit. *Brain Res.* 475, 305–316.

Shu, Y., Hasenstaub, A., Badoual, M., Bal, T., and McCormick, D. a (2003). Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *J. Neurosci.* 23, 10388–10401.

Siapas, A.G., Lubenov, E. V., and Wilson, M.A. (2005). Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* 46, 141–151.

Silver, I.A., and Erecinska, M. (1990). Intracellular and Extracellular Changes of [Ca²⁺] in Hypoxia and Ischemia in Rat Brain In Vivo. *J. Gen. Physiol.* 95, 837–866.

Singer, W. (1993). Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 349–374.

Sirois, J.E., Pancrazio, J.J., Lynch, C., and Bayliss, D.A. (1998). Multiple ionic mechanisms mediate inhibition of rat motoneurons by inhalation anaesthetics. *J. Physiol.* 512, 851–862.

Skaggs, W., McNaughton, B., Wilson, M., and Barnes, C. (1996). Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus* 6, 149–172.

Slotnick, S.D., Moo, L.R., Kraut, M.A., Lesser, R.P., and Hart, J. (2002). Interactions between thalamic and cortical rhythms during semantic memory recall in human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6440–6443.

Snodgrass, S.M., Tsuburaya, K., and Ajmone-Marsan, C. (1989). Clinical Significance of PLED: Relationship with Status Epilepticus. *J. Clin. Neurophysiol.* 6, 156–172.

- Soltesz, I., and Deschenes, M. (1993). Low- and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia. *J. Neurophysiol.* *70*, 97–115.
- Somjen, G.G. (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* *41*.
- Somjen, G.G. (2004). *Ions in the brain* (Oxford University Press).
- Sonnay, S., Duarte, J.M.N., Just, N., and Gruetter, R. (2017). Energy metabolism in the rat cortex under thiopental anaesthesia measured In Vivo by ^{13}C MRS. *J. Neurosci. Res.* *95*, 2297–2306.
- Speckmann, E.J., Elger, C.E., and Gorji, A. (2011). Neurophysiologic basis of EEG and DC potentials. In *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields*. Sixth Edition, p.
- Speckmann, E.J., Elger, C.E., and Gorji, A. (2012). Neurophysiologic basis of EEG and DC potentials. *Electroencephalogr. Basic Princ. Clin. Appl. Relat. Fields Sixth Ed.* 17–31.
- Stecker, M.M., Cheung, A.T., Pochettino, A., Kent, G.P., Patterson, T., Weiss, S.J., Bavaria, J.E., and Smith, C.R. (2001). Deep hypothermic circulatory arrest: I. Effects of Cooling on Electroencephalogram and Evoked Potentials. *Ann. Thorac. Surg.* *71*, 22–28.
- Stell, G., and Joslin, C.G. (1986). The Donnan equilibrium: A theoretical study of the effects of interionic forces. *Biophys. J.* *50*, 855–859.
- Steriade, M. (2003). The corticothalamic sleep. *Front. Biosci.* *8*, 878–899.
- Steriade, M. (2004). Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 121–134.
- Steriade, M. (2006). Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* *137*, 1087–1106.
- Steriade, M., Domich, L., Oakson, G., and Deschenes, M. (1987). The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J. Neurophysiol.* *57*, 260–273.
- Steriade, M., Curro Dossi, R., Pare, D., and Oakson, G. (1991a). Fast oscillations (20–40 Hz)

in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4396–4400.

Steriade, M., Dossi, R.C., and Nunez, A. (1991b). Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: Cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J. Neurosci.* 11, 3200–3217.

Steriade, M., Dossi, R.C., and Contreras, D. (1993a). Electrophysiological properties of intralaminar thalamocortical cells discharging rhythmic (≈ 40 Hz) spike-bursts at ≈ 1000 Hz during waking and rapid eye movement sleep. *Neuroscience* 56, 1–9.

Steriade, M., Nuñez, A., and Amzica, F. (1993b). Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillations and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J. Neurosci.* 13, 3266–3283.

Steriade, M., Amzica, F., and Nunez, A. (1993c). Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (≈ 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. *J. Neurophysiol.* 70, 1385–1400.

Steriade, M., Nunez, A., and Amzica, F. (1993d). A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: Depolarizing and hyperpolarizing components. *J. Neurosci.* 13, 3252–3265.

Steriade, M., Amzica, F., and Contreras, D. (1994). Cortical and thalamic cellular correlates of electroencephalographic burst-suppression. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 90, 1–16.

Steriade, M., Contreras, D., Amzica, F., and Timofeev, I. (1996). Synchronization of fast (30–40 Hz) spontaneous oscillations in intrathalamic and thalamocortical networks. *J. Neurosci.* 16, 2788–2808.

Steriade, M., Timofeev, I., and Grenier, F. (2001). Natural Waking and Sleep States: A View From Inside Neocortical Neurons. *J. Neurophysiol.* 85, 1969–1985.

Stewart, M., and Fox, S.E. (1991). Hippocampal theta activity in monkeys. *Brain Res.* 538, 59–63.

Swank, R.L., and Watson, C.W. (1949). Effects of barbiturates and ether on spontaneous electrical activity of dog brain. *J. Neurophysiol.* 12, 137–160.

Swanson, L.W. (1981). A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 217, 150–154.

Synek, V.M. (1990). Value of a Revised EEG Coma Scale for Prognosis after Cerebral Anoxia and Diffuse Head Injury. *Clin. EEG Neurosci.* 21, 25–30.

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.

Takaoka, S., Pearlstein, R.D., and Warner, D.S. (1996). Hypothermia reduces the propensity of cortical tissue to propagate direct current depolarizations in the rat. *Neurosci. Lett.* 218, 25–28.

Teasdale, G., and Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *Lancet* 304, 81–84.

Teich, M.C. (1992). Fractal neuronal firing patterns. In *Single Neuron Computation*, T. McKenna, J. Davis, and S.F. Zornetzer, eds. (Boston), pp. 589–625.

Thompson, S.M., Masukawa, L.M., and Prince, D.A. (1985). Temperature dependence of intrinsic membrane properties and synaptic potentials in hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurosci.* 5, 817–824.

Timic Stamenic, T., Feseha, S., Valdez, R., Zhao, W., Klawitter, J., and Todorovic, S.M. (2019). Alterations in Oscillatory Behavior of Central Medial Thalamic Neurons Demonstrate a Key Role of CaV3.1 Isoform of T-Channels during Isoflurane-Induced Anesthesia. *Cereb. Cortex* 29, 4679–4696.

Timmermann, C., Roseman, L., Williams, L., Erritzoe, D., Martial, C., Cassol, H., Laureys, S., Nutt, D., and Carhart-Harris, R. (2018). DMT models the near-death experience. *Front. Psychol.* 9, 1–12.

Timofeev, I., and Steriade, M. (1996). Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats. *J. Neurophysiol.* 76, 4152–4168.

Timofeev, I., Grenier, F., and Steriade, M. (2001). Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: An intracellular study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

98, 1924–1929.

Tøien, Ø., Blake, J., Edgar, D.M., Grahn, D.A., Heller, H.C., and Barnes, B.M. (2011). Hibernation in black bears: Independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* (80-.). *331*, 906–909.

Toyoda, H., Kawano, T., Sato, H., and Kato, T. (2021). Cellular mechanisms underlying the rapid depolarization caused by oxygen and glucose deprivation in layer III pyramidal cells of the somatosensory cortex. *Neurosci. Res.* *164*, 1–9.

Tranum-jensen, J., Janse, M.J., Fiolet, J.A.N.W.T., Krieger, W.J.G., Alnoncourt, C.N.D., and Durrer, D. (1979). Tissue Osmolality , Cell Swelling , and Reperfusion in Acute Regional Myocardial Ischemia in the Isolated Porcine Heart. 364–381.

Trojaborg, W., and Jorgensen, E.O. (1973). Evoked cortical potentials in patients with “isoelectric” EEGs. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *35*, 301–309.

Truettner, J.S., Alonso, O.F., and Dietrich, W.D. (2005). Influence of therapeutic hypothermia on matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *25*, 1505–1516.

Turrigiano, G., Abbott, L.F., and Marder, E. (1994). Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science* (80-.). *264*, 974–977.

Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., and Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* *391*, 892–896.

Uhlhaas, P.J., and Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 100–113.

Usher, M., Cohen, J.D., Servan-schreiber, D., Rajkowski, J., and Aston-jones, G. (1999). The Role of Locus Coeruleus in the Regulation of Cognitive Performance. *Science* (80-.). 283.

Vanderwolf, C.H., Buzsaki, G., Cain, D.P., Cooley, R.K., and Robertson, B. (1988). Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res.* *451*, 340–344.

Vanhatalo, S., Palva, J.M., Holmes, M.D., Miller, J.W., Voipio, J., and Kaila, K. (2004).

- Infraslow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5053–5057.
- Vanhatalo, S., Voipio, J., and Kaila, K. (2012). Infraslow EEG Activity. *Electroencephalogr. Basic Princ. , Clin. Appl. ,...* 741–747.
- Verhaegen, M., Iaizzo, P.A., and Todd, M.M. (1995). A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital and isoflurane on cerebral energy stores at the time of ischemic depolarization. *Anesthesiology* *82*, 1209–1215.
- Verkhratsky, A., Krishtal, O.A., and Petersen, O.H. (2006). From Galvani to patch clamp: The development of electrophysiology. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *453*, 233–247.
- Vicente, R., Rizzuto, M., Sarica, C., Yamamoto, K., Sadr, M., Khajuria, T., Fatehi, M., Moien-Afshari, F., Haw, C.S., Llinas, R.R., et coll. (2022). Enhanced Interplay of Neuronal Coherence and Coupling in the Dying Human Brain. *Front. Aging Neurosci.* *14*, 1–11.
- Világi, I., Klapka, N., and Luhmann, H.J. (2001). Optical recording of spreading depression in rat neocortical slices. *Brain Res.* *898*, 288–296.
- Vinck, M., Lima, B., Womelsdorf, T., Oostenveld, R., Singer, W., Neuenschwander, S., and Fries, P. (2010). Gamma-phase shifting in awake monkey visual cortex. *J. Neurosci.* *30*, 1250–1257.
- Voipio, J., Tallgren, P., Heinonen, E., Vanhatalo, S., and Kaila, K. (2003). Millivolt-scale DC shifts in the human scalp EEG: Evidence for a nonneuronal generator. *J. Neurophysiol.* *89*, 2208–2214.
- Volgushev, M., Vidyasagar, T.R., Chistiakova, M., Yousef, T., and Eysel, U.T. (2000a). Membrane properties and spike generation in rat visual cortical cells during reversible cooling. *J. Physiol.* *522*, 59–76.
- Volgushev, M., Vidyasagar, T.R., Chistiakova, M., and Eysel, U.T. (2000b). Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience* *98*, 9–22.
- Wan, X., and Puil, E. (2002). Pentobarbital depressant effects are independent of GABA receptors in auditory thalamic neurons. *J. Neurophysiol.* *88*, 3067–3077.

- Wan, X., Mathers, D.A., and Puil, E. (2003). Pentobarbital modulates intrinsic and GABA-receptor conductances in thalamocortical inhibition. *Neuroscience* 121, 947–958.
- Wang, Y.C., and Huang, R.C. (2006). Effects of sodium pump activity on spontaneous firing in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* 96, 109–118.
- Waters, J., and Helmchen, F. (2006). Background synaptic activity is sparse in neocortex. *J. Neurosci.* 26, 8267–8277.
- Weber, M.L., and Taylor, C.P. (1994). Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials. *Brain Res.* 664, 167–177.
- Wei, J., Bai, W., Liu, T., and Tian, X. (2015). Functional connectivity changes during a working memory task in rat via NMF analysis. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–13.
- Weissenborn, K., Wilkens, H., Hausmann, E., and Degen, P.H. (1991). Burst suppression EEG with baclofen overdose. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 93, 77–80.
- Wespatat, V., Tennigkeit, F., and Singer, W. (2004). Phase sensitivity of synaptic modifications in oscillating cells of rat visual cortex. *J. Neurosci.* 24, 9067–9075.
- Westmoreland, B.F., Klass, D.W., Sharbrough, F.W., and Reagan, T.J. (1975). Alpha-Coma: Electroencephalographic, Clinical, Pathologic, and Etiologic Correlations. *Arch. Neurol.* 32, 713–718.
- Westphalen, R.I., Desai, K.M., and Hemmings, H.C. (2013). Presynaptic inhibition of the release of multiple major central nervous system neurotransmitter types by the inhaled anaesthetic isoflurane. *Br. J. Anaesth.* 110, 592–599.
- White, P., Johnston, R., and Eger, E. (1974). Determination of Anesthetic Requirements in Rats. *Anesthesiology* 40, 52–57.
- Whittam, R. (1962). The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem. J.* 82, 205–212.
- Wijdicks, E.F.M. (2001). The Diagnosis of Brain Death. *New Engl. J. Med.* 67, 59–67.
- Wijdicks, E.F.M., Varelas, P.N., Gronseth, G.S., and Greer, D.M. (2010). Evidence-based

guideline update: Determining brain death in adults. *Neurology* 74.

Wilent, W.B., and Contreras, D. (2004). Synaptic Responses to Whisker Deflections in Rat Barrel Cortex as a Function of Cortical Layer and Stimulus Intensity. *J. Neurosci.* 24, 3985–3998.

Willems, L.M., Trienekens, F., Knake, S., Beuchat, I., Rosenow, F., Schieffer, B., Karatolios, K., and Strzelczyk, A. (2021). EEG patterns and their correlations with short- and long-term mortality in patients with hypoxic encephalopathy. *Clin. Neurophysiol.* 132, 2851–2860.

Williams, M.S., Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Lecas, S., Mahon, S., and Charpier, S. (2016). Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model. *J. Physiol.* 594, 6733–6751.

Williams, M.S., Lecas, S., Charpier, S., and Mahon, S. (2020). Phase-dependent modulation of cortical and thalamic sensory responses during spike-and-wave discharges. *Epilepsia* 61, 330–341.

Womelsdorf, T., Schoffelen, J.M., Oostenveld, R., Singer, W., Desimone, R., Engel, A.K., and Fries, P. (2007). Modulation of neuronal interactions through neuronal synchronization. *Science* (80-). 316, 1609–1612.

Woody, C.D., Marshall, W.H., Besson, J.M., Thompson, H.K., Aleonard, P., and Albe-Fessard, D. (1970). Brain potential shift with respiratory acidosis in the cat and monkey. *Am. J. Physiol.* 218, 275–283.

Wu, X.S., Sun, J.Y., Evers, A.S., Crowder, M., and Wu, L.G. (2004). Isoflurane Inhibits Transmitter Release and the Presynaptic Action Potential. *Anesthesiology* 100, 663–670.

Xie, Y., Zacharias, E., Hoff, P., and Tegtmeier, F. (1995). Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 587–594.

Xu, Z.C., and Pulsinelli, W.A. (1994). Responses of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus to transient forebrain ischemia: An in vivo intracellular recording study. *Neurosci. Lett.* 171, 187–191.

Xu, Z.C., and Pulsinelli, W.A. (1996). Electrophysiological changes of CA1 pyramidal

neurons following transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording and staining study. *J. Neurophysiol.* *76*, 1689–1697.

Yamakura, T., and Harris, R.A. (2000). Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels: Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* *93*, 1095–1101.

Yamatogi, Y., and Ohtahara, S. (2002). Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases. *Brain Dev.* *24*, 13–23.

Yang, J., and Zorumski, C.F. (1991). Effects of Isoflurane on N-Methyl-D-Aspartate Gated Ion Channels in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Ann. New York Acad. Sci.* *625*, 287–289.

Yang, Y., Ou, M., Liu, J., Zhao, W., Zhuoma, L., Liang, Y., Zhu, T., Mulkey, D.K., and Zhou, C. (2020). Volatile anesthetics activate a leak sodium conductance in retrotrapezoid nucleus neurons to maintain breathing during anesthesia in mice. *Anesthesiology* *824–838*.

Yenari, M.A., and Han, H.S. (2012). Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 267–278.

Yoon, K.W., and Rothman, S.M. (1991). Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J. Neurosci.* *11*, 1375–1380.

Young, G.B. (2000). The EEG in coma. *J. Clin. Neurophysiol.* *17*, 473–485.

Young, G.B. (2011). Neurologic prognosis after cardiac arrest. *Crit. Care* *15*, 605–611.

Young, J.N., and Somjen, G.G. (1992). Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain Res.* *573*, 70–76.

Young, G.B., Blume, W.T., Campbell, V.M., Demelo, J.D., Leung, L.S., McKeown, M.J., McLachlan, R.S., Ramsay, D.A., and Schieven, J.R. (1994). Alpha, theta and alpha-theta coma: a clinical outcome study utilizing serial recordings. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *91*, 93–99.

Zandt, B.J., ten Haken, B., van Dijk, J.G., and van Putten, M.J.A.M. (2011). Neural dynamics

during anoxia and the “wave of death.” *PLoS One* 6, 3–8.

Zhang, Y., Li, Z., Zhang, J., Zhao, Z., Zhang, H., Vreugdenhil, M., and Lu, C. (2019). Near-death high-frequency hyper-synchronization in the rat hippocampus. *Front. Neurosci.* 13, 1–9.

Zhao, H., Steinberg, G.K., and Sapolsky, R.M. (2007). General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1879–1894.

Zhao, W., Zhang, M., Liu, J., Liang, P., Wang, R., Hemmings, H.C., and Zhou, C. (2019). Isoflurane Modulates Hippocampal Cornu Ammonis Pyramidal Neuron Excitability by Inhibition of Both Transient and Persistent Sodium Currents in Mice. *Anesthesiology* 131, 94–104.

Zhu, P.J., and Krnjević, K. (1994). Anoxia selectively depresses excitatory synaptic transmission in hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 166, 27–30.

Zimmerman, S.A., Jones, M. V., and Harrison, N.L. (1994). Potentiation of γ -aminobutyric acid(A) receptor Cl⁻ current correlates with in vivo anesthetic potency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 987–991.