

Université de Montréal

**Effet de la transmission cholinergique sur la
cartographie fonctionnelle du cortex visuel du
rongeur**

par

Marianne Groleau

École d'Optométrie

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise

en Sciences de la Vision

option Sciences fondamentales et appliquées

août 2012

© Marianne Groleau, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Effet de la transmission cholinergique sur la cartographie fonctionnelle du cortex
visuel du rongeur

Présenté par :
Marianne Groleau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Maurice Ptito
président-rapporteur

Elvire Vaucher
directrice de recherche

Christian Casanova
co-directeur

Jean-François Bouchard
membre du jury

Résumé

La transmission cholinergique, et notamment muscarinique, joue un rôle déterminant dans le système nerveux central au niveau de la modulation de la plasticité neuronale. La libération d'ACh dans le cortex visuel est concomitante à la présentation de stimuli visuels. Par son action sur la transmission neuronale corticale, l'ACh module à long terme les réponses à de nouveaux stimuli sensoriels. Dans la présente étude, l'implication du système cholinergique au niveau du développement cortical et de la plasticité inductible chez l'adulte a été étudiée par les techniques d'imagerie optique des signaux intrinsèques et d'immunohistochimie chez le rongeur. Ces deux techniques de cartographie de l'activité corticale nous ont permis d'évaluer, d'une part, l'impact modulateur de l'acétylcholine (ACh) et de ses récepteurs muscariniques (mAChRs, M_1 à M_5) sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel chez des souris déficitaires pour les mAChRs et, d'autre part, l'impact de la libération d'ACh lors d'un entraînement visuel, sur le nombre, la nature neurochimique et la localisation au niveau des couches corticales des neurones corticaux activés.

L'implication du système cholinergique sur la cartographie du cortex visuel primaire a été étudiée sur les souris génétiquement modifiées délétères (knock out : KO) pour différentes combinaisons de sous-types de mAChRs. L'imagerie des signaux intrinsèques, basée sur les changements de réflectance corticale de la lumière survenant lors de la consommation d'oxygène par les neurones activés, a permis de déterminer, lors de stimulations visuelles, les différentes composantes des propriétés des neurones du cortex visuel. La taille des champs récepteurs des neurones est diminuée lors de l'absence du récepteur M_1 ou de la combinaison M_1/M_3 . Le champ visuel apparent est augmenté chez les souris M_2/M_4 -KO mais diminué chez les M_1 -KO. La finesse des connectivités neuronales (évaluée par la mesure du scatter du signal) est réduite lors de l'absence des récepteurs M_2/M_4 . Finalement, chez les animaux M_1/M_3 -KO, une diminution de l'acuité visuelle est observée.

L'effet à long-terme d'un entraînement visuel couplé à une stimulation des neurones cholinergiques sur la distribution et la nature des neurones immunoréactifs au c-Fos,

c'est-à-dire les neurones activés, a été évalué. Puisque cette stimulation combinée est en mesure de produire des modifications comportementales, notamment au niveau de l'acuité visuelle, il devenait intéressant de s'attarder aux modifications neuroanatomiques et de déterminer quels éléments de l'équilibre exciteur/inhibiteur sont compromis chez ces animaux. Les résultats obtenus démontrent que les animaux ayant reçu une combinaison de l'entraînement cholinergique et visuel présentent une augmentation du marquage c-Fos comparativement aux animaux n'ayant reçu que la stimulation cholinergique. D'autre part, chez ces animaux, il est possible d'observer des modifications de l'équilibre exciteur/inhibiteur qui correspond au potentiel plastique de la région.

En conclusion, ces études démontrent un rôle important du système cholinergique dans le développement, la maturation et la plasticité du système visuel cérébral.

Mots-clés : cartographie, récepteurs muscariniques, cortex visuel, activité corticale

Abstract

The cholinergic transmission, including the muscarinic receptors, plays a role in the central nervous system modulating neuronal plasticity. ACh is released in the visual cortex during the presentation of visual stimuli. By its action on cortical neuronal transmission, ACh modulates long-term responses to new sensory stimuli. In the present study, the involvement of the cholinergic system in cortical development and inductible plasticity in adults was investigated by optical imaging of intrinsic signals and immunohistochemistry in rodents. These two mapping techniques of cortical activity allowed us to evaluate 1) the modulatory effect of acetylcholine (ACh) and its muscarinic receptors (mAChRs, M₁ to M₅) on the functional organization of the visual cortex in mice deficient of mAChRs and 2) the impact of ACh release during a visual training on the number, neurochemical nature and location of activated neurons in the cortical layers.

The involvement of the cholinergic system on the mapping of the primary visual cortex was studied in mice knockout (KO) for different combinations of mAChRs subtypes. Intrinsic signals imaging, based on fluctuations in cortical light reflectance during oxygen consumption by activated neurons, was used to assess the various properties of neurons in the visual cortex during visual stimulation. The size of the neuronal receptive fields is reduced in the absence of M₁ receptor or the combination M₁/M₃. The apparent visual field is increased in M₂/M₄-KO mice but decreased in M₁-KO. The sharpness of neuronal connectivity (assessed by the measure of the scatter) is reduced in the absence of M₂/M₄ receptors. Finally, in M₁/M₃-KO animals, a decrease in visual acuity was observed.

The effect of long-term visual training coupled with the stimulation of cholinergic neurons on the distribution and nature of immunoreactive neurons in c-Fos, the activated neurons, was evaluated. Since this combined stimulation is able to produce behavioral changes, especially in terms of visual acuity, it was interesting to focus on

neuroanatomical modifications and determine which elements of the excitatory / inhibitory balance were compromised in these animals. The results showed that animals which received a combination of visual and cholinergic training presented an increase in c-Fos labeling compared to animals that received only the cholinergic stimulation. Moreover, in these animals, it is possible to observe changes in the excitatory / inhibitory balance which corresponds to the potential of plasticity in the region.

In conclusion, these studies demonstrate an important role of the cholinergic system in the development, maturation and plasticity of the cerebral visual system.

Keywords : cartography, muscarinic receptors, visual cortex, cortical activity

Table des matières

<i>Liste des tableaux</i>	<i>x</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xi</i>
<i>Abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvi</i>
<i>I. Introduction</i>	<i>1</i>
I.1. Le système visuel de la souris	2
I.1.1. Rétine	2
I.1.2. Projections sous-corticales des CGRs	3
I.1.3. Cortex visuel	5
I.1.3.1. Types cellulaires corticaux.	6
I.1.4. Organisation corticale et cartes rétinotopiques.....	8
I.2. Système cholinergique	11
I.2.1. Acétylcholine	12
I.2.1.1. Synthèse et dégradation de l'acétylcholine	13
I.2.1.2. Récepteurs de l'acétylcholine.....	15
Récepteurs nicotiniques	15
Récepteurs muscariniques.....	16
I.2.1.3. Fonctions de l'acétylcholine	19
I.2.2. Action cholinergique sur le système visuel	20
I.2.3. Plasticité et activité neuronale.....	21
I.3. Cartographie du cortex visuel primaire	24
I.3.1. Imagerie optique des signaux intrinsèques.....	24
I.3.1.1. Les signaux intrinsèques.....	25
Le couplage neurovasculaire.....	25
I.3.1.2. Types de stimulations visuelles	26
Stimulation épisodique.....	26
Stimulation périodique.....	28
I.3.2. L'immunohistochimie.....	30

I.4. Raisonnement, hypothèses et objectifs	31
I.4.1. Raisonnement.....	31
I.4.2. Hypothèses.....	31
I.4.3. Objectifs.....	32
II. Résultats	33
II.1. Impact des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire de la souris	34
II.1.1. Impaired functional organization in the visual cortex of muscarinic receptors knock out mice	35
ACKNOWLEDGMENTS.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUCTION.....	36
MATERIAL AND METHODS.....	38
Animal preparation.....	38
Optical imaging.....	39
Stimulation.....	39
Acquisition.....	39
Data Analysis.....	40
Statistical analysis.....	40
Immunohistochemistry.....	41
Stereological estimation of fibre density and varicosity.....	41
RESULTS.....	42
Using optical imaging of intrinsic signals and immunohistochemistry, we assessed visual properties and cholinergic innervation of V1 of muscarinic receptors KO mice compared to wt littermates.....	42
Spatiotemporal properties.....	42
Influence of mAChR on the organizational properties of V1.....	43
The area of V1 was not affected by mAChR deletion.....	43
Functional organization of the adult visual cortex in mAChR KO mice.....	44
Apparent visual field representation is increased in M2/M4-KO mice.....	44
Alteration of the quality of the retinotopic maps in M2/M4-KO mice.....	44
Anatomical correlates of V1.....	45

<i>ChAT-related anatomical properties of V1</i>	45
DISCUSSION	45
Involvement of muscarinic receptors in the function of the primary visual cortex:	46
Involvement of muscarinic receptors in the structural development of the primary visual cortex:	46
Structural organization	47
CONCLUSION	48
REFERENCES	49
II.1.2. Résultats supplémentaires	62
II.1.3. Technique d'imagerie : description détaillée	64
Préparation animale	64
Imagerie optique des signaux intrinsèques	65
Stimulations visuelles	66
Réponses hémodynamiques	66
Sensibilité aux contrastes	66
Sélectivité à la fréquence spatiale	67
Rétinotopies	67
Surface de la ROI	68
Index d'ovalité	68
Ratio des harmoniques	68
Index du scatter	69
Champ visuel apparent	69
<i>II.2. Induction à long-terme d'une augmentation de la réactivité neuronale dans le cortex visuel du rat suite à un entraînement visuel couplé à une stimulation cholinergique.....</i>	70
II.2.1. Visual training paired with electrical stimulation of the basal forebrain improves orientation selective visual acuity in the rat.	72
ACKNOWLEDGMENTS	72
ABSTRACT	73
INTRODUCTION	73
MATERIAL AND METHODS	75
Animal preparation	75
Visual water maze testing	76

Electrode implantation and surgery	77
Pairing visual/sham training with HDB electrical stimulation.....	78
HDB electrical stimulation	78
Immunohistochemistry	79
Statistical analysis.....	81
RESULTS.....	81
Pairing visual training with HDB activation in awake rats increases visual discrimination performance in a water maze task.....	81
Pairing visual training with HDB activation in awake rats is specific for cholinergic projections from HDB to V1	83
Improvement of visual discrimination performance for a 30° grating by pairing visual training with HDB activation in awake rats do not occur at the expense of – or transfer to other orientations	83
Pairing visual training with HDB activation in awake rats increases the amplitude of visual evoked potentials in V1	84
Pairing visual training with HDB activation in awake rats dramatically increases c-Fos immunoreactivity in V1	85
Pairing visual training with HDB activation in awake rats activates both GABAergic and glutamatergic neurons in V1.....	85
DISCUSSION	86
VS/HDB activation induces long-term changes in V1 related to perceptual learning	86
Visual processing is modulated by cholinergic activity.....	88
Reorganization induced by cholinergic system activation is mediated by change of excitatory-inhibitory balance	89
CONCLUSION	90
REFERENCES	91
<i>III. Discussion.....</i>	<i>106</i>
III.1. Rappel des hypothèses et des résultats obtenus.....	107
III.2. Techniques de cartographies utilisées.....	109
III.3. Induction d'une plasticité chez l'adulte.....	110
III.3.1. Évaluation de l'activité corticale à l'aide du marquage c-Fos	111
III.3.2. Variation de l'équilibre excitateur/inhibiteur	112

III.4. Évidences de l'implication du système cholinergique dans le développement cortical	113
III.4.1. Influence des lignées	114
III.4.2. L'absence des mAChRs ne produit pas de modifications des propriétés de l'organisation générale du cortex occipital	115
III.4.3. L'absence des mAChRs provoque des modifications des propriétés fonctionnelles du cortex occipital	116
III.4.3.1. Caractérisation de l'impact des mAChRs	117
<i>IV. Perspectives</i>	<i>122</i>
<i>V. Difficultés rencontrées</i>	<i>124</i>
<i>VI. Bibliographie.....</i>	<i>i</i>

Liste des tableaux

II.1. Impact des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire de la souris

Table 1. Stereological quantification of cholinergic fibers and number of varicosities on ChAT-immunostained mouse primary visual cortex.....p.56

II.2. Induction à long terme d'une augmentation de la réactivité neuronale dans le cortex visuel du rat suite à un entraînement visuel couplé à une stimulation cholinergique

Table 1. Pre and post-training visual acuity for the 30° orientation sine-wave grating.....p.98

Table 2. Number and nature of activated neurons in monocular area of the activated visual cortex.....p.98

Liste des figures

I. Introduction

Figure 1. Représentation du système visuel de la souris.....	p.4
Figure 2. Organisation visuotopique du cortex visuel de la souris.....	p.10
Figure 3. Projections cholinergiques chez le rat.....	p.14
Figure 4. Voies métaboliques associées à l'activation des récepteurs muscariniques	p.18
Figure 5. Spectre d'absorption de l'hémoglobine.....	p.27
Figure 6. Cartes rétinotopiques selon la technique de stimulation visuelle choisie	p.29

II. Résultats

II.1. Impact des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire de la souris

Figure 1. Evaluation of the optimal spatial frequency.....	p.57
Figure 2. Evaluation of the C_{50}	p.58
Figure 3. Organization of the KO visual cortex.....	p.59
Figure 4. Cholinergic fibres and varicosities.....	p.61
Figure 5. Différences entre les souches contrôles utilisées.....	p.63
Figure 6. Visualisation des vaisseaux par transparence du crâne.....	p.66
Figure 7. Obtention d'une carte rétinotopique.....	p.68

II.2. Induction à long terme d'une augmentation de la réactivité neuronale dans le cortex visuel du rat suite à un entraînement visuel couplé à une stimulation cholinergique

Figure 1. Timeline of the experimental procedure and stimulus parameter for different groups.....	p.99
--	------

Figure 2. Change of visual acuity in each experimental paradigm.....p.100

Figure 3. Localization of the electrode implantation sites on coronal sections at the level of HDB.....p.102

Figure 4. Cortical response of V1 in CTL, VS, HDB, VS/HDB and VS/HDB/Sco conditions.....p.103

Figure 5. Neurochemical phenotype of activated c-Fos neurons in V1.....p.104

IV. Difficultés rencontrées et perspectives

Figure 7. Distinction entre la rétinotopie chez la souris et chez le rat.....p.126

Abréviations

Ach	acétylcholine
AChE	acétylcholine estérase
Arc	activity-regulated cytoskeletal-associated protein
BF	télocéphale basal (ou basal forebrain)
CCD	coupled charge device
CGL	corps genouillé latéral
CGR	cellule ganglionnaire de la rétine
ChAT	choline acétyl transférase
CR	calrétinine
CS	colliculus supérieur
deg	degré
HDB	bras horizontal de la Bande diagonale de Broca
HHb	désoxy-hémoglobine
IEG	gène immédiat précoce (ou immediate early gene)
ISI	imagerie des signaux intrinsèques
KO	knock out
LPZ	zone de projection corticale
LTD	dépression à long terme
LTP	potentialisation à long terme
M1	récepteur muscarinique 1
M2	récepteur muscarinique 2
M3	récepteur muscarinique 3
M4	récepteur muscarinique 4
M5	récepteur muscarinique 5

mAChR	récepteur muscarinique de l'acétylcholine
nAChR	récepteur nicotinique de l'acétylcholine
O₂Hb	oxy-hémoglobine
PV	parvalbumine
RF	champ récepteur (ou receptive field)
ROI	région d'intérêt
Sap	saporine
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SOM	somatostatine
TH	tyrosine hydroxylase
V1	cortex visuel primaire
V1b	cortex visuel primaire binoculaire
V1m	cortex visuel primaire monoculaire
V2	cortex visuel secondaire
VAcHT	transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VEP	potentiels évoqués visuels
VS	stimulation visuelle
WT	Wild Type

Allons au fond de l'inconnu pour trouver du nouveau

Charles Beaudelaire

Remerciements

Après trois ans de maîtrise à travailler sur mon projet de recherche (combien de modifications de projet déjà? cinq? huit? disons que ça fait un moment que j'ai arrêté de les compter) et après, je crois, être passée du plan A au plan ZZ, je suis toujours de bonne humeur, je crois que c'est un signe qui me dit que finalement, j'ai les capacités de poursuivre en recherche. Merci Elvire de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions et d'avoir fait en sorte que mon projet ne dérive pas trop. Merci sincèrement pour tous vos encouragements, votre bonne humeur et votre dynamisme, cela amène une atmosphère très agréable dans le laboratoire. Merci Christian d'être passé me voir à chaque expérience d'imagerie en me disant que la prochaine irait mieux. Il faut croire que vous aviez effectivement raison! Merci Matthieu de m'avoir littéralement tenu la main dans l'apprentissage de l'imagerie optique, et sans qui j'aurais probablement déjà lancé un ordinateur à bout de bras avec ma non compréhension de tout ce qui se rapporte à Matlab, Vdaq, branchage de fils quelconques (tiens, tout ce qu'il faut pour faire de l'imagerie, bizarre...) et ce, malgré quelques inquiétudes que j'ai eues (disons une à chaque semaine, c'est à dire à chaque fois que tu te mettais à jouer dans les fils du lab3...). Merci Geneviève d'avoir été présente chaque fois que quelque chose ne fonctionnait pas (voir ci haut...), merci aussi pour tous les cafés offerts, je crois que je te dois au moins trois cent pintes de lait. Pour ton prochain cadeau de Noël, je crois que je vais t'acheter une vache qui produit du lait sans lactose et l'installer dans ton bureau. Merci Karine de m'avoir constamment répété qu'il s'agissait de ma maîtrise et que si je voulais la finir dans un avenir rapproché, il fallait que je choisisse les sujets qui m'intéressaient malgré les bonnes idées apportées par mes directeurs afin d'enrichir mon projet (soyez certains qu'ils en ont...). Merci Sébastien à non seulement m'avoir aidée à mettre mes idées en place pour la rédaction de ce mémoire, et aussi de m'avoir soutenue avec mes difficultés MATLAB (aussi nombreuses ont-elles été)... Merci Florence d'avoir été patiente avec moi lors de

l'apprentissage de l'immunohistochimie. Merci d'avoir animé le labo de ta présence, merci aussi d'être revenue en faire autant après ton départ, une chance que tu n'étais pas loin, on aurait vraiment eu de la difficulté à tout trouver. Merci aux autres membres des laboratoires Vaucher et Casanova. Merci à Elwise (haha!! Vive le Cheese Cake Factory!!!), je crois qu'on s'est mutuellement soutenues et entendues chialer durant nos maîtrises (quoi que ça doit bien faire 13 ans qu'on chiale et qu'on se plaint ensemble!!!). J'espère qu'on aura réussi à déposer nos mémoires en même temps. En tout cas, on était bien parties! Merci à ma sœur Laurence. Merci pour toutes tes danses contemporaines ainsi que pour tes nombreuses remises à l'ordre lors de l'écriture de ce mémoire. Finalement, merci à mes parents qui m'ont supportée (et nourrie...et déménagée...2x) malgré mon départ de la maison et qui sont toujours restés positifs sur ma réussite. Merci. Ne doutez jamais de mon amour et de mon appréciation, sachez que je considère vraiment que ce que je suis devenue, je vous le dois.

On se revoit pour la suite!!

I. Introduction

Une tâche importante du cerveau est de produire un comportement adapté à son environnement et à ce titre, l'interprétation de l'information sensorielle est capitale. La compréhension des capacités des aires visuelles centrales à traiter l'information provenant de la rétine est étudiée depuis longtemps. Leonard da Vinci et Descartes (à leur époque) se sont penchés sur la question et ont effectué plusieurs croquis des composantes du système visuel. Toutefois, leurs descriptions ne démontraient pas encore l'intégration des différentes modalités nécessaires à la vision, de la rétine au cortex. Les sciences ayant évolué depuis, il est aujourd'hui possible de cartographier les différentes portions cérébrales et même d'en visualiser l'activité.

I.1. Le système visuel de la souris

L'utilisation de souris pour étudier le système visuel est très courante. Toutefois, les souris ont longtemps été délaissées car leur acuité visuelle et leur vision binoculaire est beaucoup plus faible que celles d'autres mammifères, notamment des humains (0.5 cycles/deg comparativement à 6 cycles/deg chez le chat et jusqu'à 80 cycles/deg chez les primates) (Sinex et al., 1979, Gianfranceschi et al., 1999, Prusky et al., 2000). Pourtant, l'organisation et les propriétés du système visuel des souris ressemble beaucoup à celui des mammifères supérieurs avec la présence de projections rétino-colliculaires et géniculocorticales et des sous-types fonctionnels semblables de cellules rétinienne et corticales (Drager, 1975, Niell and Stryker, 2008).

I.1.1. Rétine

La rétine, organe visuel récepteur, est la membrane interne qui tapisse le fond de l'œil. La rétine est composée de trois couches cellulaires (nucléaires interne et externe et ganglionnaire) et de deux couches synaptiques (plexiformes interne et externe). Elle contient chez le vertébré environ 80 types cellulaires différents (Dacey, 2000). Tout d'abord, les deux types de photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes, ont comme fonction principale de capter et transformer le signal lumineux provenant des photons en influx

nerveux. Ce signal est ensuite transféré aux cellules bipolaires qui font le lien entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Toutefois, elles ont aussi des connexions avec les cellules horizontales inhibitrices et les cellules amacrines. Ce sont les axones des CGRs qui se regroupent et forment le nerf optique. Il s'agit des seules cellules rétinienne qui se projettent vers le reste du système nerveux central (SNC). En effet, les axones des cellules ganglionnaires quittent l'oeil par le nerf optique et chaque hémichamp visuel se projette controlatéralement (Fig. 1). De plus, le patron de croisement des fibres optiques varie selon l'espèce. Chez le rongeur, les fibres demeurent amalgamées jusqu'au chiasma optique et s'y mélangent avec les fibres de l'autre oeil. Chez le primate, les fibres ayant une cible ipsilatérale restent entre elles et poursuivent une voie latérale qui fait en sorte qu'elles ne rencontrent pas le chiasma optique (Neveu and Jeffery, 2007, Jeffery et al., 2008). Leur cible principale est le corps genouillé latéral (CGL). Chez la souris, c'est entre 95%-97% des neurones qui traversent au niveau du chiasma optique pour se rendre majoritairement au collicule supérieur (CS) controlatéral ou en faible partie au CGL qui se projette sur le cortex visuel primaire (V1) (Hattar et al., 2006, Chalupa and Williams, 2008).

I.1.2. Projections sous-corticales des CGRs

Les structures qui reçoivent les influx nerveux provenant de la rétine sont essentiellement, chez le rongeur, le collicule supérieur et le corps genouillé latéral. Le CS est le récipiendaire d'entre 70% et 100% des axones des cellules ganglionnaires alors que le reste des projections rétinienne atteignent le CGL. Le CGL envoie ensuite des projections au cortex visuel (Hofbauer and Drager, 1985, Hattar et al., 2006, Chalupa and Williams, 2008).

Le CGL est un noyau thalamique de bas niveau qui fait partie de la voie visuelle dite consciente. Le corps genouillé latéral du rongeur n'est pas organisé en couches tel que chez le chat ou le primate, mais bien composé de deux sections, l'une ventrale et l'autre dorsale.

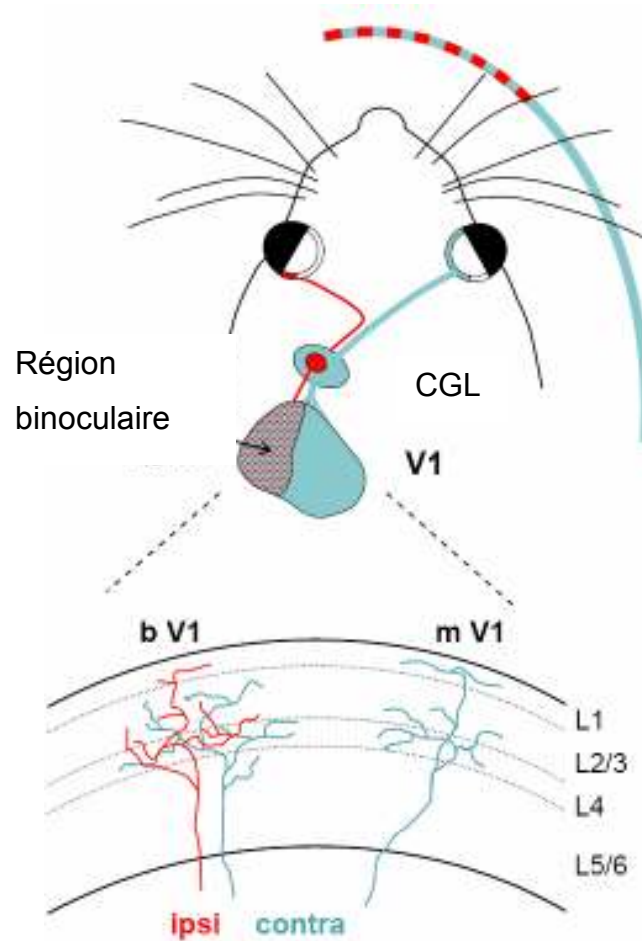


Figure 1. : Représentation du système visuel de la souris. La grande majorité des axones des CGRs décussent au niveau du chiasma optique pour se projeter dans le CGL controlatéral (voie en bleu), le reste (en rouge) consiste en la voie ipsilatérale. Puis, les axones du CGL innervent V1. mV1 (V1 monoculaire), bV1 (V1 binoculaire) (adapté de Hofer et al., 2006b)

Les CGRs envoient leurs projections dans la portion dorsale du CGL (le CGLd) (Reese, 1988). Il a longtemps été pensé que les projections venant des rétines ne se mélangeaient pas comme dans le cortex visuel, mais restaient séparées en régions provenant de chaque oeil (Werner and Chalupa, 2004). Toutefois, des études plus récentes tendent à démontrer que les projections ganglionnaires atteignent une région du CGLd où la majorité des cellules répondent binoculairement (Drager and Olsen, 1980, Grieve, 2005). Bien que cela semble contradictoire avec le fait qu'à peine 3-5% des CGRs se projettent ipsilatéralement, il semblerait que la majorité des cellules du CGLd recevant des projections ipsilatérales reçoivent aussi des projections excitatrices contralatérales directes. En effet, malgré la faible contribution ipsilatérale, le volume de connexions serait plus important (Reese, 1988, Grieve, 2005). Le CS, lui, est situé dans le mésencéphale et contrôle les mouvements réflexes des yeux et de la tête. Ces projections de la rétine qui transitent par le CS se rendent dans le thalamus, dont le CGL, et se rendent au cortex visuel.

I.1.3. Cortex visuel

Le cortex visuel primaire est une portion du cortex occipital, et est aussi appelé V1, cortex strié ou encore aire 17. En effet, selon l'espèce étudiée, le terme employé varie. Comme toutes les aires corticales, le cortex visuel est une structure stratifiée composée de six « couches ». La couche IV du cortex visuel se caractérise par une épaisse strate de cellules pyramidales et est le lieu de terminaisons des projections thalamiques. Toutefois, les projections thalamiques ont aussi été observées dans les couches III et VI. Dans le cadre de la communication intra-corticale du cortex visuel, les neurones de la couche IV vont ensuite propager l'information visuelle aux couches supragranulaires (couches I, II et III) et aux couches infragranulaires (couches V et VI) (revue par Van Hooser, 2007). La couche II/III envoie elle aussi de longues projections vers les neurones pyramidaux des couches infragranulaires de V1. Ces derniers se projettent vers les couches corticales et vers des structures sous-corticales comme le CS (couche V) et le CGL (connexions *feed-back* (couche VI)) (Burkhalter, 1989).

Le cortex visuel primaire est divisé en deux portions, l'une monoculaire (V1m), et l'autre binoculaire (V1b). La portion binoculaire de V1 est grandement innervée par l'arborisation des axones provenant de l'œil controlatéral (Hofer et al., 2006a). Chez la souris, la portion binoculaire correspond à une zone de 30-40 deg du champ visuel (Dräger, 1978). Bien que ce soit une petite surface, il faut comprendre que la souris a les yeux positionnés de façon temporale. En effet, plus les yeux sont frontaux, plus grande est la région binoculaire. Ainsi, le lapin qui a des yeux temporaux a une zone binoculaire de 25 deg tandis que le chat a une grande région binoculaire (90 deg) dû à ses yeux très frontaux (Chalupa and Williams, 2008). De plus, chaque neurone cortical reçoit des projections en provenance de peu de CGR (Sirotin and Das, 2010). En effet, les projections de la rétine vers le cerveau sont perturbées chez les animaux albinos. Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine ne décussent pas normalement au chiasma optique, provoquant une diminution des fibres ipsilatérales et une augmentation correspondante des projections controlatérales. Il y a donc une modification des cartes corticales (Fleming et al., 2006). Cela produit entre autre une modification des portions monoculaires et binoculaire du cortex visuel primaire (Volpicelli and Levey, 2004).

I.1.3.1. Types cellulaires corticaux.

Chez le rongeur, le cortex est divisé en aires striée (cortex visuel primaire ou V1) et extrastriées (aires qui entourent V1). Ces aires sont liées par des projections antérogrades (*feedforward*) et rétrogrades (*feedback*) excitatrices et ces connexions sont nécessaires à l'établissement du traitement cognitif de l'information visuelle. Les projections thalamo-corticales ou cortico-corticales atteignent à la fois les cellules pyramidales et les interneurons corticaux GABAergiques qui ont une action inhibitrice sur les cellules pyramidales (Gonchar and Burkhalter, 2003). L'information sensorielle est transmise par les différentes projections (décrites à la fin de la section précédente) entre les neurones pyramidaux excitateurs corticaux. Chez le rongeur, dans une colonne de 0.3mm de diamètre, il y a environ 7 500 neurones. Ceux-ci diffèrent selon les couches. Dans la couche IV, qui reçoit les afférences du CGLd, ce sont les cellules étoilées épineuses (*spiny stellate*

cells) qui y sont majoritaires. Il s'agit d'interneurones excitateurs, donc glutamatergiques, qui ne se retrouvent que dans la couche IV des aires sensorielles primaires (revue par (Markram et al., 2004)). Au niveau du cortex visuel primaire du rongeur, la grande majorité des cellules ne sont pas pyramidales, bien que ce soit ce type cellulaire qui intègre et transmet l'information visuelle en provenance du CGLd. Chez le rat, environ 15% de la population neuronale de V1 est de type GABAergique. Ces neurones, qui modulent l'activité des cellules excitatrices, peuvent être séparés en trois groupes : les cellules immunoréactives à la parvalbumine (PV), à la calrétinine (CR) et à la somatostatine (SOM). Les cellules PV représentent 51% des neurones GABAergiques. Les cellules CR et les SOM représentent chacune 17%. Le reste constitue d'autres types neuronaux immunoréactifs à la calbindine ou à l'oxyde nitrique synthétase (Gonchar and Burkhalter, 1997). La grande majorité des interneurones GABAergiques sont de type cellules en panier (*basket cells*, 50%). Ces cellules ont comme objectif de cibler les dendrites proximales ainsi que le soma des cellules pyramidales et GABAergiques ce qui leur permet d'ajuster la réponse synaptique. Elles expriment la PV. En fait, il existe une panoplie d'interneurones. En plus des cellules en panier, il existe les cellules chandelier, exprimant la PV et ayant pour cible les axones, les cellules bipolaires, qui contactent principalement les cellules pyramidales et expriment la CR, les cellules double bouquet exprimant la CR et inhibant les dendrites basales des cellules pyramidales, les cellules à double bouquet (*bitufted cells*) exprimant la CR (Markram et al., 2004).

Les récipiendaires du prix Nobel David Hubel et Torsten Wiesel ont caractérisé les cellules excitatrices pyramidales du cortex visuel du chat selon la complexité de leur champ récepteur (RF). Un neurone n'est activé que lorsqu'une stimulation est présentée dans une région précise de l'espace, le RF. Il s'agit en fait de l'endroit précis où un stimulus doit être présenté pour pouvoir activer cette cellule et ce, peu importe le stimulus présenté. Ils ont donc divisé ces cellules en deux catégories soit les cellules simples et complexes. Les champs récepteurs simples sont divisés en deux portions, l'une inhibitrice et l'autre excitatrice et répondent à des stimuli stationnaires ou en mouvement qui doivent pour être

optimaux éclairer grandement la portion excitatrice et légèrement la portion inhibitrice. Évidemment, le stimulus en question doit posséder la bonne orientation et la bonne grandeur. Les cellules complexes quant à elles, reçoivent des inputs de plusieurs cellules simples. À l'instar de ces dernières, elles répondent à un stimulus d'une certaine orientation, mais contrairement à elles, le stimulus ne doit pas être dans une région précise du RF pour activer la cellule. En effet, leur RF est plus permissif quant à la position du stimulus. De plus, leur RF est large et empiète grandement sur les RFs des cellules voisines (Smith and Hausser, 2010). La majorité des cellules de V1 sont de type complexe. Ce sont d'ailleurs ces cellules qui sont sélectives à la direction (Hubel and Wiesel, 1962, 1965). Chez la souris, environ 80% des cellules retrouvées dans le cortex visuel peuvent être classifiées selon leur réponse à des stimuli en mouvement ou orientés. La majorité des neurones sélectifs à l'orientation se retrouvent dans les couches II/III où ils semblent être organisés en petits agrégats d'orientation. Ces neurones sont aussi classifiés en simples ou complexes et la majorité est unidirectionnelle. Plusieurs cellules sont quant à elles non-sélectives à l'orientation, c'est à dire qu'elles répondent à des barres (ou des points) dans toutes les orientations. Elles sont d'ailleurs séparées en diverses catégories, les cellules asymétriques, qui répondent mieux à un stimulus bougeant selon une ou deux direction(s) sur un axe et les cellules symétriques qui répondent quelle que soit la forme du stimulus, son orientation ou sa direction (ce sont les cellules dites ON et OFF). Ces cellules se retrouvent dans toutes les couches corticales, mais prédominent dans la couche IV (Mangini and Pearlman, 1980, Metin et al., 1988).

I.1.4. Organisation corticale et cartes rétinotopiques

Dès le début des années 1960, des études en électrophysiologie ou encore en neuroanatomie ont permis de démontrer l'existence de cartes d'organisation bidimensionnelles dans le cortex visuel (Hubel and Wiesel, 1962, Berman and Cynader, 1972, Drager, 1975) appelées cartes visuotopiques ou rétinotopiques. Cette organisation corticale de la représentation visuelle est ordonnée (Fig. 2). Ces cartes se forment complètement avant l'ouverture de l'œil

donc avant le début de la vision. Les cartes rétinotopiques du champ visuel se retrouvent à la fois au niveau du CGL, du CS et du cortex visuel. L'organisation centre (excitateur)-pourtour (inhibiteur) des RFs corticaux de la souris ressemble grandement à ce qui est observé chez le singe macaque, ce qui rend l'utilisation de la souris très utile pour étudier la plasticité des RFs (Van den Bergh et al., 2010). Même un tout petit stimulus est en mesure d'activer les champs récepteurs d'une grande quantité de neurones. Des cartes ordonnées sont observées dans différentes structures des voies visuelles comme dans V1 et dans le CGL, mais aussi dans d'autres portions corticales comme le cortex somatosensoriel. Il est maintenant connu, justement grâce aux cartes rétinotopiques, que les neurones qui sont proches dans une aire corticale ont des RFs avoisinants dans l'espace visuel. En effet, la projection de CGRs rapprochées dans la rétine s'effectue vers des neurones proches dans le cerveau.

Bien que les cartes d'organisation, comme la rétinotopie, soient présentes chez tous les mammifères, chez le rongeur, les neurones des aires visuelles corticales semblent s'organiser de manière aléatoire, comparativement, par exemple, au carnivore ou au primate. Chez ces derniers, on peut observer la présence d'autres types d'organisation corticale telles les cartes d'orientation ou de direction. Chez les rongeurs, ces cartes semblent absentes, créant ainsi une organisation corticale de type poivre et sel, c'est-à-dire aléatoire plutôt qu'organisée (Drager, 1975, Girman et al., 1999, Niell and Stryker, 2010, Bonin et al., 2011). Notez toutefois que l'existence de modules d'orientation ou de direction n'est pas nécessaire à la vision de haute acuité ou à la sélectivité à l'orientation (Van Hooser et al., 2005). En effet, le rongeur possède aussi des cellules sélectives à l'orientation (Niell and Stryker, 2008).

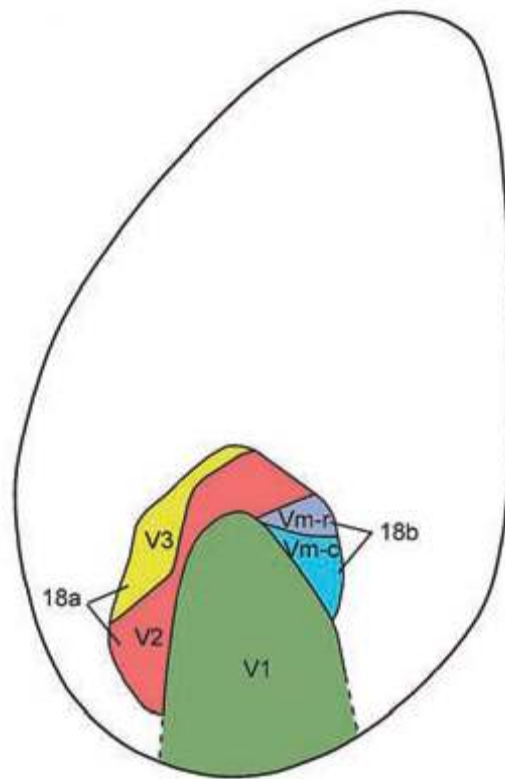


Figure 2. : Organisation visuotopique du cortex visuel de la souris. Hémisphère gauche. L'aire visuelle primaire (V1) est représentée en vert. L'aire cytoarchitectonique 18a contient les aires secondaire (V2) et tertiaire (V3) et l'aire 18b contient les aires visuelles rostrale (Vm-r) et caudale (Vm-c) médianes (adapté de Chapula et Williams, 2008).

Il est possible, donc, de se questionner sur l'utilité de ce type d'organisation. Chez les espèces qui ne possèdent pas de cartes d'orientation il y aurait plus de chevauchement des treillis (il s'agit en fait de la superposition des cellules) de cellules ON et OFF, mais leur probabilité de connectivité serait plus faible. Ceci produirait des moirés (régions denses en cellules ou au contraire où les cellules sont plus dispersées) de cellules ON et OFF possédant beaucoup d'interférence (Ringach, 2007, Paik and Ringach, 2011). C'est donc dire que, dans ce cas, les cellules avoisinantes ont des préférences d'orientation qui diffèrent car la période du patron d'interférence devient comparable à la distance entre le centre des champs récepteurs des plus proches voisines, provoquant une mosaïque poivre et sel telle qu'observée chez le rongeur.

Les projections cortico-corticales se terminent tout autour de V1 et sont couramment appelées V2. Des études poussées ont plutôt démontré l'existence de 15 aires distinctes aux abords de V1 de nature visuelle, somatosensorielle, motrice et limbique (Wang and Burkhalter, 2007).

I.2. Système cholinergique

La transmission cholinergique joue un rôle déterminant dans le système nerveux central au niveau des mécanismes de la mémoire, de l'attention, de l'apprentissage et de la plasticité neuronale. En effet, par son action sur la transmission neuronale corticale, l'acétylcholine (ACh) influence les neurones corticaux en modulant les réponses à de nouveaux stimuli sensoriels. Au niveau de la vision cela se reflète par la présence de fibres cholinergiques dans le cortex visuel.

Historiquement, l'ACh a été suggérée comme étant un neurotransmetteur par Henry Hallett Dale en 1914 (Dale, 1914), mais ce sont les expériences d'Otto Loewi en 1921 (Loewi, O. 1921) qui l'ont certifié. Bien que cette découverte eu lieu au niveau du coeur, plusieurs études subséquentes ont démontré l'implication de l'ACh au niveau d'autres tissus et son implication dans les processus de haut niveau cognitif tels l'attention, la mémoire et

l'apprentissage. Aujourd'hui, l'implication du système cholinergique dans la vision est aussi étudiée. Par exemple, lors d'une tâche d'attention, le niveau de décharge des neurones augmente. Au niveau du cortex visuel primaire, une augmentation de cette activité neuronale dépend de l'acétylcholine. En effet, il a été démontré qu'une stimulation visuelle par réseau sinusoïdaux est en mesure d'accroître la relâche d'ACh dans le cortex visuel primaire ainsi que d'augmenter le marquage au c-Fos, marqueur de l'activité neuronale (Laplante et al., 2005). L'implication de l'ACh dans la plasticité développementale de V1 est de mieux en mieux connue, notamment grâce à son implication dans le développement de la dominance oculaire (Bear and Singer, 1986, Gu, 2003). Chez l'adulte, la stimulation du système cholinergique facilite la réponse aux stimuli visuels par des mécanismes ressemblant à la potentialisation à long terme (Kang and Vaucher, 2009).

Les projections cholinergiques centrales provenant du télencéphale basal (BF) et du pons peuvent être séparées en six voies (Fig. 3). Les neurones du noyau septal médial (Ch1) se projettent dans l'hippocampe, la portion latérale verticale et horizontale du noyau de la bande diagonal de Broca (Ch2 et Ch3) se projette dans l'hippocampe, le cortex occipital et dans le bulbe olfactif, le noyau basal de Meynert (Ch4) se projette dans le manteau cortical et dans l'amygdale, le noyau pedunculo pontin (Ch5) et le noyau tegmental latérodorsal (Ch6) dans le thalamus, la substance noire et le collicule supérieur (Mesulam et al., 1983, Lamour et al., 1988), (Lucas-Meunier et al., 2003). L'innervation cholinergique dans le cortex provient des neurones magnocellulaires présents dans le télencéphale basal - Ch1-Ch4 (Eckenstein et al., 1988).

I.2.1. Acétylcholine

Bien que l'intérêt ici se porte sur les cellules nerveuses, la découverte de l'ACh en tant que tel a eu lieu grâce à une expérience menée par Otto Loewi (1921) sur la régulation des battements du coeur par le nerf vague et le nom initial donné à l'ACh était substance vagale (Kandel and Squire, 2000). L'ACh, qui fait office de neuromodulateur dans le cerveau et influence l'efficacité synaptique (Krnjevic, 2004), est impliquée dans des processus

cognitifs de haut niveau tels l'attention (Sarter et al., 2005), la mémoire et l'apprentissage (Deutsch, 1971, Drachman and Leavitt, 1974, Quirion et al., 1989, Hasselmo, 2006). L'ACh est libérée dans le cortex visuel suite à une stimulation visuelle (Laplante et al., 2005, Sarter et al., 2005) et y joue un rôle dans la régulation de l'intégration spatiale. Par exemple, dans des coupes corticales de V1 de rats, l'ACh réduit la propagation de l'activité excitatrice (Kimura et al., 1999). De plus, il a clairement été démontré que la libération d'ACh est accrue dans le cortex sensoriel suite à la présentation d'un stimulus (par exemple, un stimulus visuel activera les noyaux thalamiques cholinergiques) mais le lien direct entre l'ACh et la vision n'est pas encore très clair (Collier and Mitchell, 1966, Kilgard and Merzenich, 1998, Laplante et al., 2005).

I.2.1.1. Synthèse et dégradation de l'acétylcholine

L'ACh est synthétisée par l'action de la choline acétyl transférase (ChAT), une enzyme cytosolique, à partir de la choline et de l'acétyl-coenzyme A. L'ACh cytosolique est ensuite concentrée dans les vésicules synaptiques par une pompe vésiculaire avec l'aide du transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT). Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, l'ACh est relâchée rapidement dans la zone active. La libération d'acétylcholine est due à la fusion des vésicules synaptiques à la membrane cellulaire suite à l'activation des cellules cholinergiques provenant du télencéphale basal (Origlia et al., 2008) qui fait augmenter la concentration calcique intracellulaire. L'ACh est ainsi relâchée dans la fente synaptique et agit au niveau des récepteurs de l'acétylcholine (AChRs) sur le neurone post-synaptique. L'ACh libre dans la fente est ensuite hydrolysé par l'acétylcholinestérase (AChE) et la

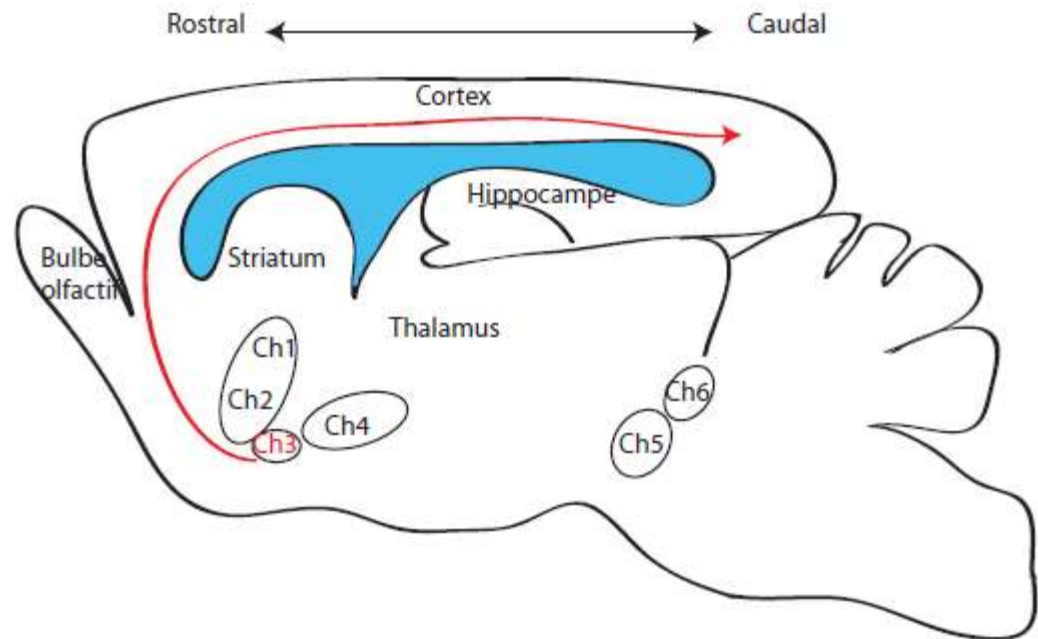


Figure 3. Projections cholinergiques chez le rat. Les neurones cholinergiques se rendant au cortex occipital proviennent directement de la HDB (Ch3) (adapté de Lucas-Meunier et al., 2003).

choline est récupérée par le neurone pré-synaptique avec l'aide du transporteur de la choline (ChT) rendant ainsi la choline à nouveau disponible à la formation d'acétylcholine (pour revue voir Rand, 2007).

I.2.1.2. Récepteurs de l'acétylcholine

Les récepteurs de l'acétylcholine sont exprimés au niveau des cellules neuronales (et non-neuronales: cellules gliales, endothéliales,...) et celle-ci agit sur les cibles post-synaptiques dans le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Il existe deux types de récepteurs cholinergiques par lesquels l'ACh peut agir dans le système nerveux central : les récepteurs ionotropiques nicotiques (nAChRs) et les récepteurs métabotropiques muscariniques (mAChRs) (M_1 à M_5).

Récepteurs nicotiques

Les nAChRs sont des récepteurs ionotropiques composés de cinq sous-unités, généralement 2 sous-unités α et 3 β , qui sont perméables aux cations. Par contre, il existe une grande quantité de ces différentes sous-unités, ce qui procure aux nAChRs une grande diversité. En effet, 1728 nAChRs ont été répertoriés, permettant une variété de degrés de sensibilité aux agonistes et antagonistes de la nicotine (Steinlein, 1998) qui sont en mesure de moduler la relâche d'une pléiade de neurotransmetteurs tels l'ACh, le glutamate, la dopamine, le GABA, la noradrénaline (revue par (Wonnacott, 1997)). Le premier récepteur nicotinique à avoir été caractérisé est le $\alpha 4\beta 2$ et c'est le plus répandu au niveau cortical suivi du récepteur $\alpha 7$ (le récepteur alpha modulerait d'ailleurs la plasticité neuronale en influençant la croissance axonale) (Nordman and Kabbani, 2012). Ils sont présents au niveau des cellules amacrines de la rétine, au niveau du CS, du CGL et de V1 (Gotti and Clementi, 2004). Ils se retrouvent d'ailleurs au niveau du corps cellulaire, des dendrites et des axones de plusieurs cellules telles les cellules GABAergiques, glutamatergiques, cholinergique (Albuquerque et al., 2009).

Récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques de l'ACh sont connus comme étant impliqués dans la régulation de l'activité de nombreuses fonctions des systèmes nerveux centraux (Hulme et al., 1990, Wess et al., 1990, Bymaster et al., 2003) tels la mémoire et l'apprentissage (Quirion et al., 1989, Hasselmo and Stern, 2006). Notez d'ailleurs que M₁ est le récepteur principal au niveau cortical (Porter et al., 2002). Les récepteurs muscariniques dans le SNC sont impliqués dans les contrôles moteurs, dans la régulation de température et la régulation cardiaque ainsi que dans la mémoire. Il a été démontré que le blocage des mAChRs cause des déficits d'apprentissage (Baxter et al., 1996). De plus, les mAChRs auraient des potentiels thérapeutiques lors de l'application de certains agents sélectifs dans certaines maladies telles l'Alzheimer et le Parkinson (Caulfield and Birdsall, 1998) et c'est par son action sur différents récepteurs muscariniques que l'ACh peut éliminer dans les neurones corticaux les réponses synaptiques inhibitrices ou excitatrices (Kimura and Baughman, 1997). Cinq gènes de récepteurs muscariniques ont été caractérisés, codant chacun pour un sous-type différent de récepteur muscarinique.

Les premiers récepteurs muscariniques qui ont été clonés sont m1 et m2 et l'ont été vers le milieu des années 80 (Kubo et al., 1986a, Kubo et al., 1986b). Puis, vers la fin de cette décennie, les gènes de m3, m4 et m5 étaient découverts (Caulfield and Birdsall, 1998). Les mAChRs sont des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Il s'agit donc d'une sous-unité à 7 domaines transmembranaires hydrophobes, ayant une portion N-terminale extracellulaire, trois boucles extracellulaires, une intracellulaire et une portion C-terminale intracellulaire (le récepteur muscarinique en tant que tel) qui interagit avec protéine G. Ces séquences sont hautement conservées entre les différentes espèces de mammifères comme la souris, le rat et l'humain (Bymaster et al., 2003, Volpicelli and Levey, 2004). La variabilité entre les différents sous-types de récepteurs réside principalement dans la troisième boucle intracellulaire. Les mAChRs M₁/M₃ et M₂/M₄ sont très semblables au point de vue de leur fonction et mode d'action. Cela fait référence à leur couplage à un type particulier de protéine G et à leur localisation

cellulaire puisqu'il semble que les récepteurs M_1 et M_3 soient essentiellement post-synaptiques tandis que M_2 et M_4 seraient pré-synaptiques et agiraient en tant qu'autorécepteurs (*feedback* négatif) ou encore en tant qu'hétérorécepteurs en agissant sur les canaux Ca^{2+} afin de réguler la transmission synaptique (pour revue voir Lucas-Meunier et al., 2003).

Les mAChRs M_1 , M_3 et M_5 sont couplés à la famille $G\alpha_{q/11}$ et activent les phospholipases C et D, menant à la relâche de seconds messagers inositolphosphate (Nathanson, 2000). Ces récepteurs modulent certaines fonctions métabotropiques ainsi que la transmission synaptique de type rapide et sont principalement situés au niveau des terminaisons postsynaptiques. Les récepteurs M_2 et M_4 sont plutôt couplés aux sous-unités α de $G_{i/o}$ et inhibent l'activité de l'adenylyl cyclase en inhibant les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage (Fig. 4) (Egan and North, 1986, Lucas-Meunier et al., 2003, Origlia et al., 2008). Ces récepteurs (ainsi que le récepteur nicotinique $\alpha 7$) activent aussi les MAPKs, qui ont pour fonction de régulariser, entre autre, la plasticité synaptique (Roberson et al., 1999).

De plus, il y a une distinction moléculaire à faire entre les deux groupes de récepteurs muscariniques provenant de la séquence de la troisième boucle interne qui ferait varier la préférence à un type de protéine G plutôt qu'à un autre (Wess, 1993). Les récepteurs muscariniques principaux dans le cortex du rongeur sont $M_1 \gg M_2 > M_4 > M_3$ (Kuczewski et al., 2005a, Kuczewski et al., 2005b).

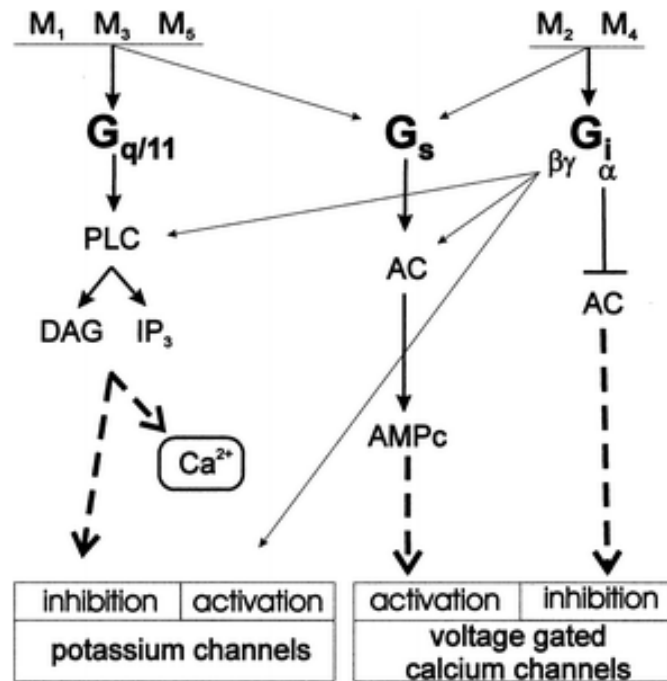


Figure 4. Voies métaboliques associées à l'activation des récepteurs muscariniques. Les voies de signalisation intracellulaire visent entre autre à la formation d'une plasticité synaptique. (adapté de Lucas-Meunier et al., 2003)

Le récepteur M_1 de l'acétylcholine est fortement exprimé dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Il est présent à la fois au niveau des cellules pyramidales et GABAergiques (Mash and Potter, 1986, Kimura and Baughman, 1997). L'équipe de Levey a calculé la proportion de chacun des récepteurs dans le cortex du rat. M_1 est le plus abondant avec 40% à 50% du total des mAChRs exprimés (Levey et al., 1991, Levey, 1993). Il est maintenant assumé que le récepteur muscarinique de l'acétylcholine M_1 est impliqué dans les processus de mémoire et d'apprentissage (Bymaster et al., 2003). Les souris qui ne possèdent pas ce récepteur démontrent une hyperactivité mais ne présentent pas de déficiences cognitives majeures, les phénomènes compensatoires durant le développement semblent donc être importants pour pallier à ce déficit (Sarter and Bruno, 1997, Miyakawa et al., 2001a). Le récepteur M_2 est l'autre récepteur très abondant dans le cortex et est l'autorécepteur inhibiteur principal au niveau des terminaisons cholinergiques présynaptiques dans l'hippocampe et le cortex cérébral de la souris. Chez les souris M_2 KO, comme la fonction d'autorécepteur est réduite, cela produit une augmentation de la relâche cérébrale d'ACh. Le récepteur M_4 , quand à lui, est prédominant au niveau du striatum (Zhang et al., 2002b). Le fait qu'il existe des récepteurs muscariniques pré- et post-synaptiques donne à l'ACh le pouvoir d'agir en tant qu'activateur ou inhibiteur de la cellule post-synaptique.

I.2.1.3. Fonctions de l'acétylcholine

L'ACh joue un rôle important dans le développement cérébral. En effet, les AChR et l'enzyme de synthèse choline acetyltransférase (ChAT) sont présents dans le système nerveux de l'embryon (Dori and Parnavelas, 1989, Zoli et al., 1995). Des études ont démontré une action de l'ACh sur la croissance de neurites, la formation de filopodes et lamellipodes (Rosner and Fischer, 1996, Kozma et al., 1997). Dans le cortex cérébral, le système cholinergique est impliqué dans la réorganisation des connectivités neuronales (Aztiria et al., 2004).

Par exemple, lorsqu'exposé à de l'amphétamine (agissant sur la recapture de la dopamine), le cerveau en développement ne mature pas normalement. L'amphétamine, tout comme l'ACh, joue sur la fonction cognitive. L'exposition à cette drogue augmente la densité de neurones cholinergiques provenant du télencéphale basal ainsi que la quantité de mAChRs, sans toutefois affecter la densité de cellules GABAergiques (Siegel et al., 2011a, b). En effet, l'ACh est impliquée dans la modulation de l'attention par son interaction avec les mAChRs et c'est pourquoi l'exposition à certaines drogues chez le fœtus ou jusqu'à l'adolescence cause des certains déficits attentionnels par leurs impacts sur le système cholinergique.

I.2.2. Action cholinergique sur le système visuel

Les projections cholinergiques atteignant le cortex occipital proviennent du télencéphale basal (BF) (Mesulam et al., 1983, Luiten et al., 1987, Gaykema et al., 1990). Sa fonction majeure est d'améliorer le codage sensoriel et le BF agit sur des circuits neuronaux modulateurs locaux (von Engelhardt et al., 2007) et étendus (Goard and Dan, 2009).

L'ACh joue un rôle de facilitation de la réponse aux stimuli visuels par des mécanismes ressemblant à la potentialisation à long terme (LTP) qui impliquent à la fois les récepteurs muscariniques et nicotiques dans le cortex visuel (Kang and Vaucher, 2009). Il semble que l'efficacité de la transmission neuronale soit affectée par l'activation cholinergique qui ajusterait avec précision le temps de la réponse neuronale (Rodriguez et al., 2010). L'ACh est aussi largement impliquée dans l'attention visuelle (il s'agit de l'habileté à détecter un stimulus pertinent) où une augmentation de la décharge neuronale est observée lors d'une tâche d'attention. En effet, l'ACh est nécessaire à l'attention de type top-down (où la sensibilité de la réponse neuronale est modulée selon la pertinence accordée au stimulus) et le système cholinergique serait donc impliqué dans la fonction cognitive (Deco and Thiele, 2011)

L'utilisation en immunohistochimie d'un marqueur de la ChAT a permis de déterminer que les neurones présentant l'enzyme de synthèse étaient non-pyramidaux (de forme bipolaire) et que la ChAT était prédominante dans les couches II et III bien que dispersée entre les couches II à VI. Les fibres la présentant se situent principalement dans la couche V et forment un réseau axonal épais et étendu dans le cortex visuel (Parnavelas et al., 1986). D'ailleurs, durant la période critique visuelle murine, les neurones ChAT-positifs expriment la calrétinine (donc cellules GABAergiques). C'est lors de cette période que le système cholinergique se met en place. Il s'agit bien sûr d'une étape importante à la cytoarchitecture ainsi qu'à la synaptogénèse (Consonni et al., 2009). Durant cette période, une lésion du BF modifie la dominance oculaire des cellules visuelles corticales sans toutefois affecter leur sélectivité à l'orientation ou la taille de leurs RFs. Pourtant, chez ces animaux, suite à cette période, la distribution de la dominance oculaire n'est pas différente de celle des animaux normaux. C'est donc dire qu'une lésion des neurones du noyau cholinergique faite durant la période critique n'affecte que temporairement le développement cortical compétitif (Siciliano et al., 1997)

Chez le chat, une application dans de CGL d'atropine (antagoniste muscarinique) supprime la réponse visuelle de neurones normalement facilitée par l'ACh de même qu'elle augmente celle des neurones normalement inhibée par l'ACh. Il semble en effet que l'ACh endogène soit en mesure de moduler la réponse neuronale corticale (Sato et al., 1987b) et qu'elle joue un rôle prédominant en ce qui a trait au traitement de l'information visuelle de V1 en contrôlant le gain de la réponse par les récepteurs muscariniques ainsi que nicotiques (Soma et al., 2012a).

I.2.3. Plasticité et activité neuronale

Une partie du travail effectué lors de cette maîtrise est l'évaluation des types cellulaires impliqués dans la formation d'une plasticité de type potentialisation à long terme. Il convient donc de déterminer ce qu'est la plasticité. Il s'agit de l'habileté d'adaptation à l'environnement et il en existe plusieurs types dont la plasticité synaptique et la plasticité

corticale. À la différence de la plasticité synaptique qui change la force des synapses et par conséquent la transmission du signal nerveux, la plasticité corticale correspond à des changements ayant lieu au niveau des microcircuits et de l'organisation corticale.

Afin de bien comprendre la plasticité, il importe de décrire la synapse : c'est l'endroit d'apposition et de communication privilégiée entre les neurones. Généralement, cette jonction s'effectue au niveau axo-dendritique, axo-axonal ou axo-somatique. Il existe deux types de synapses, électrique et chimique. La plus fréquente est la synapse chimique excitatrice ou inhibitrice. Lorsqu'une cellule nerveuse est activée, cela se traduit par la formation d'un potentiel d'action qui migre le long de l'axone et entraîne la libération des neurotransmetteurs stockés dans les vésicules synaptiques au niveau de l'arborisation terminale ou le long de l'axone. Et selon la nature du neurotransmetteur libéré et des récepteurs, il en résulte l'activation (glutamate) ou l'inhibition (GABA) de la cellule post-synaptique.

Il devient ainsi intéressant de s'attarder au postulat de Hebb sur la plasticité synaptique qui propose l'hypothèse selon laquelle la covariance entre les activités pré- et post-synaptiques est un facteur critique déterminant le sort d'une synapse. Il s'agit d'un postulat qui décrit les changements dans la connexion entre un neurone pré-synaptique A et un neurone post-synaptique B. Il existe une covariance positive où, dans une synapse entre A et B, l'activation est corrélée répétitivement avec la décharge de B, l'activation post-synaptique serait renforcée. La covariance négative survient lorsque la synapse entre A et B devient silencieuse au moment de la décharge de B. Cette dernière perdrait de son efficacité (Fregnac and Schulz, 1988). Ces changements seraient de longue durée. Durant le développement, il en résulte l'élimination des synapses surnuméraires. Aujourd'hui, les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme (LTP et LTD) sont connus et suivent cette théorie. En effet, c'est l'activité corrélée des neurones A et B sur le neurone C qui produisent ces phénomènes. Ces deux formes de plasticité synaptique, qui sont notamment régulées par le système cholinergique, sont largement impliquées dans la formation des connectivités neuronales de même que dans la mémoire et l'apprentissage

(Brocher et al., 1992). Il a été démontré qu'une réduction de l'innervation corticale cholinergique avait comme conséquence de produire une LTD plutôt qu'une LTP (Kuczewski et al., 2005b). Les mAChRs sont maintenant connus comme étant impliqués dans les phénomènes de potentialisation ou de dépression à long terme. En effet, l'équipe d'Origlia a montré sur des coupes de cerveau *in vitro* que la potentialisation à long terme dans le cortex visuel est modulée par la combinaison des mAChRs M₂ et M₄ et qu'en l'absence de cette alliance, la LTP est absente. Le couplage à un type particulier de protéine G est donc nécessaire à la formation d'une potentialisation à long terme. Il semblerait aussi que chez les souris KO pour le récepteur M₁, l'affinité des récepteurs M₂ et M₄ pour l'ACh serait accrue par rapport au récepteur M₃ (Origlia et al., 2006).

Le moment dans le développement où s'effectuent normalement ces modifications dans le cortex visuel s'appelle la période critique. Cette période correspond à une fenêtre temporelle dans l'évolution de la croissance d'un animal ou d'un individu. Il est connu que l'inhibition intracorticale mature en correspondance avec la progression de la période critique (Harauzov et al., 2010). C'est durant cette période que se construisent les cartes corticales. La plasticité du cortex visuel a été évaluée avec l'étude de la dominance oculaire lors de la période critique. En suturant de manière monoculaire, il est possible d'observer un déplacement de la réponse vers l'œil non défavorisé, c'est-à-dire que les neurones qui auraient normalement répondu à l'œil qui a été suturé, répondent maintenant à l'œil normal. Ces effets ont tout d'abord été démontrées chez le chat (Wiesel and Hubel, 1965), mais on observe aussi ce phénomène chez la souris (Cang et al., 2008a). Il est à noter que les mécanismes dépendants de l'activité jouent durant la période critique chez un animal afin de maintenir et d'éventuellement modifier les structures corticales.

Chez l'adulte, la représentation corticale est dynamique et est continuellement remodelée par des expériences comportementales. Cette réorganisation correspond à des modifications des connexions locales et de leurs inputs en réponse à un comportement défini. Pour ce faire, il faut que la balance normale excitation-inhibition soit compromise (Hensch, 2005a). Un haut niveau de potentiel de plasticité est présent dans le cerveau adulte, mais les

mécanismes intracorticaux inhibiteurs y sont prédominants (Fregnac and Schulz, 1988) et la plasticité cellulaire inhibitrice est donc plus lente à survenir que la plasticité excitatrice (Gandhi et al., 2008).

I.3. Cartographie du cortex visuel primaire

Dans l'optique où ces changements doivent être observés, les techniques de cartographie corticale telles la neuroimagerie ou la neuroanatomie s'imposent. Elles permettent de visualiser les microcircuits cérébraux impliqués dans les processus cognitifs. Deux techniques ont été utilisées dans notre étude pour déterminer l'organisation fonctionnelle et structurelle : l'imagerie optique des signaux intrinsèques (ISI) et l'immunohistochimie.

I.3.1. Imagerie optique des signaux intrinsèques

L'imagerie optique des signaux intrinsèques a été développée par l'équipe de Grinvald et a été utilisée ici pour visualiser l'activité du cortex visuel (Grinvald et al., 1986a, Grinvald et al., 1986b, Ts'o et al., 1990). Elle est basée sur des mesures hémodynamiques qui permettent d'observer l'activité neuronale, considérant que l'activité neuronale entraîne une consommation d'oxygène et glucose véhiculés par le sang et donc une augmentation de débit sanguin. Traditionnellement, les techniques utilisées pour étudier le cerveau consistaient en des enregistrements neuronaux extracellulaires, très invasifs, surtout pour de larges portions corticales, et très laborieux, nécessitant l'anesthésie des animaux sur plusieurs heures, voire jours. Chez la souris, l'ISI est une méthode de choix puisqu'elle permet la mesure des changements hémodynamiques du cerveau à travers l'os crânien qui est mince et translucide. Ainsi l'intégrité du cerveau et de la pression intracrânienne est conservée. Il devient donc possible d'imager la même souris à répétition, de manière chronique. De plus, la résolution spatiale de la technique est très bonne (de l'ordre de 100 μ m sur de larges portions du cortex) (Polimeni et al., 2005). Il a été relevé que cette technique serait probablement celle qui combine le mieux la résolution spatiale, l'étendue de la zone imagée et la vitesse de cartographie du cortex. Maintenant, l'ISI est utilisée pour

étudier l'architecture fonctionnelle de plusieurs régions corticales. Elle peut être utilisée chez l'animal éveillé et permet d'étudier le développement cérébral ainsi que la plasticité corticale (Zepeda et al., 2004).

I.3.1.1. Les signaux intrinsèques

L'activité neuronale provoque des réponses hémodynamiques et métaboliques et l'imagerie optique se base sur l'observation de ces facteurs intrinsèques des tissus neuronaux. Ces signaux sont captés à l'aide d'une caméra CCD (coupled-charge device) qui enregistre la réflexion de la lumière sur le cortex. Cette réflectance est produite par lesdits signaux intrinsèques qui sont une modification du ratio oxy/désoxy-hémoglobine suite à la consommation d'oxygène par les neurones, suivie d'une augmentation du volume sanguin, afin de réapprovisionner en oxygène la zone activée, ainsi qu'une augmentation du débit sanguin (Hillman et al., 2007). Ces changements couvrent normalement une plus grande surface que la zone activée. L'imagerie des signaux intrinsèques est maintenant couramment utilisée pour imager le cortex et peut être utilisée sur plusieurs espèces animales. Dès 1986, l'équipe de Grinvald l'utilisait afin d'imager le cortex du chat et du rat (Grinvald et al., 1986a). Aujourd'hui, cette technique est utilisée chez les souris, lapins, primates, tree shrews et même chez l'oiseau.

Le couplage neurovasculaire

L'imagerie optique des signaux intrinsèques mesure les changements d'absorption de l'hémoglobine. Une lumière dans l'infrarouge est utilisée afin d'éclairer le cortex cérébral et est absorbée par des chromophores, principalement l'hémoglobine du sang, qui possède des propriétés d'absorbance qui diffèrent selon que son état soit oxygéné (oxyhémoglobine (O_2Hb)) ou désoxygéné (désoxyhémoglobine (HHb)) (Ferrari et al., 2004). La longueur d'onde choisie pour les expériences d'imagerie (630 nm) est celle couramment utilisée et qui permet d'obtenir une différence d'absorption maximale entre O_2Hb et HHb. La figure 5 présente le spectre d'absorption de l'hémoglobine. Dans un cas comme l'imagerie optique des signaux intrinsèques où l'objectif est d'aller observer les variations d'oxygénation

sanguine et de volume sanguin, il est important d'utiliser une longueur d'onde où la différence entre les courbes d'absorbance de l'HHb et de O₂Hb est grande. En effet, si une longueur d'onde isobétique était utilisée, c'est-à-dire une longueur d'onde où il n'y a pas de différence d'absorption, le signal ne prendrait pas en compte les variations d'oxygénation (Frostig et al., 1990, Vanzetta et al., 2005).

I.3.1.2. Types de stimulations visuelles

Différents types de stimulations visuelles ont été proposés pour démontrer, en ISI, l'activation des différentes populations neuronales dans le cortex visuel. Elles sont utilisées pour obtenir des cartes d'activation corticale.

Stimulation épisodique

La stimulation épisodique est une façon d'obtenir des cartes rétinotopiques qui consiste en la présentation de stimulations dans des portions délimitées du champ visuel. La carte rétinotopique est une combinaison de deux autres cartes. La carte d'activation corticale qui correspond à l'intensité de l'activité de la population neuronale étudiée et la carte de phase qui permet d'observer l'activation des différentes populations de neurones en fonction du temps. Souvent, les réseaux sinusoïdaux sont utilisés et sont présentés en petites sections à différentes positions de manière à finalement couvrir complètement le champ visuel. Ensuite, les différentes cartes d'activation obtenues sont regroupées et la carte globale est reconstituée (Fig. 6A de (Schuett et al., 2002, Gias et al., 2005)). Les réseaux sinusoïdaux ont été utilisés dans le premier volet du mémoire, mais ont été appliqués sur l'ensemble de l'écran de stimulation lors des études de contraste et de fréquence spatiale (pour plus de détails, voir la section matériel et méthodes). En effet, dans ces cas, l'objectif n'était pas de reconstruire une carte rétinotopique mais bien d'observer la réponse hémodynamique.

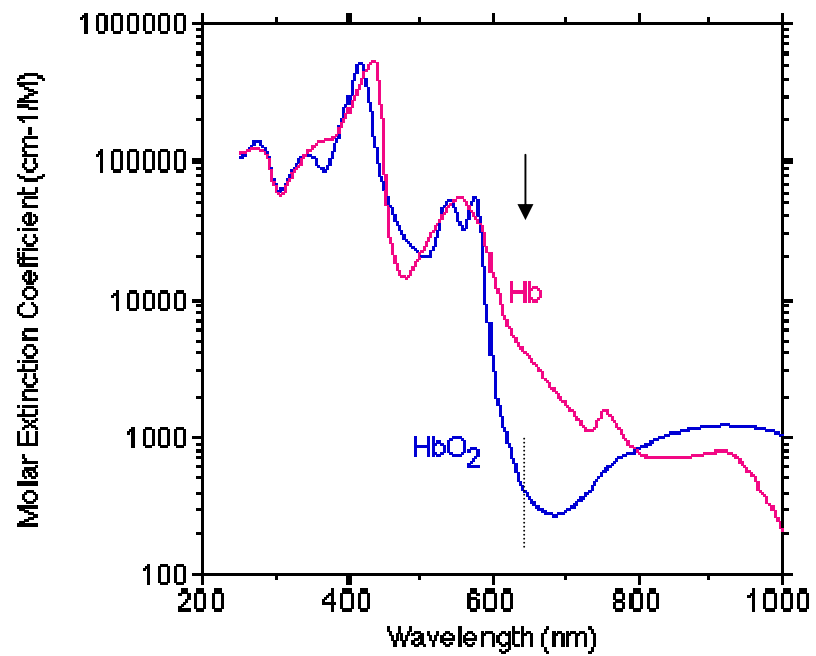


Figure 5. Spectre d'absorption de l'hémoglobine. Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (bleu) et réduite (rouge). La flèche et le pointillé présentent la longueur d'onde 630 nm utilisée lors des expérimentations.

Stimulation périodique

La stimulation périodique a été proposée par Kalatsky & Stryker (2003) et a comme avantage important de réduire grandement la durée des enregistrements. Dans ce type de stimulation, le stimulus est présenté périodiquement, et suite à l'application de la transformée de Fourier au signal, il est possible de retracer la réponse suscitée à la fréquence de stimulation présentée (Kalatsky and Stryker, 2003). Le principe est simple, une barre lumineuse verticale ou horizontale est présentée sur un fond contrasté et balaye la surface entière de l'écran de stimulation durant 10 minutes, à une fréquence déterminée par l'expérimentateur. Ce faisant, l'activation des populations neuronales se fait régulièrement, et ce, à vitesse et intervalles constants, et est décalée dans le temps en fonction de la position dans l'espace visuel du stimulus. Il est donc possible d'obtenir des cartes rétino-topiques ou visuotopiques (Fig. 6B). La transformée de Fourier donne des indications sur l'amplitude du signal à la fréquence de stimulation et sur la phase de la réponse, qui correspond au délai d'activation. Les cartes rétino-topiques sont construites ainsi, en combinant une carte d'amplitude du signal et une carte de phase. C'est ce type de stimulation visuelle qui a été utilisé lors de nos expérimentations.

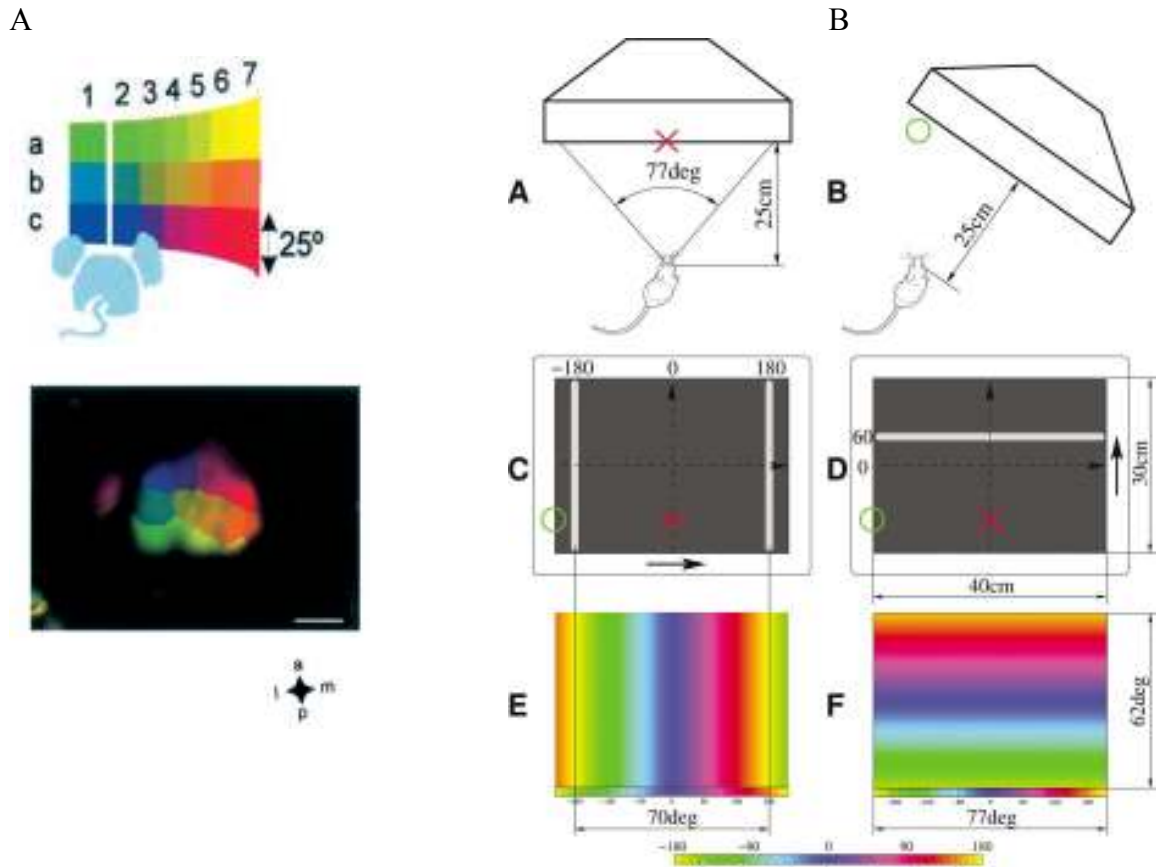


Figure 6. Cartes rétinotopiques selon la technique de stimulation visuelle choisie. En A, la technique de stimulation visuelle épisodique où plusieurs cartes sont combinées afin d'obtenir une carte rétinotopique globale (adapté de Schuett et al., 2002). En B, la technique de stimulation périodique où un stimulus en continu est présenté afin d'obtenir une carte rétinotopique (adapté de Kalatsky and Stryker, 2003). Dans les deux cas, chaque portion du champ visuel est représentée par une couleur.

I.3.2. L'immunohistochimie

Lorsqu'il est question d'évaluer la plasticité, les études démontrent souvent des modifications comportementales (par exemple, la mesure de l'acuité visuelle). Ces changements comportementaux sont le résultat de changements observables au niveau moléculaire. Une technique qui est utilisée afin d'évaluer quels types cellulaires sont présents dans un tissu est l'utilisation de l'immunohistochimie. Il s'agit d'utiliser un anticorps ciblé contre un peptide (récepteur, protéines nucléaires, enzyme, hormone) qui s'y fixera et, après la révélation, il est possible pour l'expérimentateur de détecter la présence de la protéine. Il est ainsi possible de révéler des molécules d'adhésion, des facteurs de transcription ou encore des types cellulaires comme les neurones GABAergiques immunoréactifs à la parvalbumine, à la somatostatine, à la calrétinine ou des neurones pyramidaux (ceux utilisés dans le cadre de cette maîtrise). La technique permet aussi de visualiser l'activité neuronale. En effet, les Immediate-early genes (IEG), que l'on pourrait traduire par gènes précoces immédiats, sont des outils importants dans l'identification de l'activité neuronale. Il s'agit de protooncogènes rétroviraux, et il en existe plusieurs types tels c-fos, c-jun et c-myc. L'un des plus utilisés pour étudier l'activité neuronale est le c-fos. C'est d'ailleurs lui qui a été utilisé dans les expériences décrites dans ce mémoire. En effet, sa présence dans le cerveau à l'état basal est très faible mais est inductible de façon transitoire par différents facteurs extracellulaires. Sa détection en immunohistochimie est aisée et son marquage peut facilement être combiné à d'autres (pour revue voir Kovacs, 2008). Il existe aussi d'autres marqueurs de l'activité neuronale tels l'Arc (Activity-regulated cytoskeletal-associated protein) qui joue un rôle dans la potentialisation à long terme et la formation de la mémoire, ainsi que la TH (tyrosine hydroxylase) qui est un marqueur de l'activité neuronale durant l'allaitement.

I.4. Raisonnement, hypothèses et objectifs

I.4.1. Raisonnement

À la lumière des faits mentionnés plus haut, on peut apercevoir certaines évidences quant à un lien fonctionnel entre le système cholinergique et le cortex visuel. Ces parallèles sont :

- 1) L'information sensorielle provenant du CGLd est intégrée et transmise par les neurones excitateurs pyramidaux mais est modulée par l'activité des neurones inhibiteurs et des fibres cholinergiques.
- 2) Le système cholinergique est impliqué dans le développement cérébral et a une action sur la réorganisation des connectivités neuronales.
- 3) Les mAChRs sont impliqués dans la formation de la LTP, dans l'attention et la plasticité.
- 4) Une stimulation visuelle permet d'accroître la relâche d'ACh dans le cortex visuel ce qui mène à une augmentation de l'activité corticale détectable immunohistochimiquement par une augmentation du marquage intracellulaire c-Fos.

Tous ces rapprochements convergent vers le concept d'une implication majeure du système cholinergique dans le développement cérébral et dans la modulation de l'activité corticale et constituent la base de ce projet.

I.4.2. Hypothèses

Ces rapprochements nous ont permis de poser deux hypothèses. D'une part que les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine étant impliqués dans la modulation de plusieurs fonctions du SNC provoqueront des modifications de la cartographie fonctionnelle et de la sensibilité des neurones de V1 et d'autre part que l'activation cholinergique modifiera l'activation neuronale, ce qui aura des répercussions sur l'équilibre excitateur/inhibiteur.

I.4.3. Objectifs

L'objectif général du projet est d'étudier l'implication du système cholinergique dans la cartographie du cortex visuel primaire du rongeur. Le travail présenté dans ce mémoire met en évidence d'une part la plasticité développementale des connectivités neuronales et d'autre part la plasticité induite chez l'adulte.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont :

- 1) Évaluer l'impact des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle de V1. L'imagerie optique des signaux intrinsèques sera utilisée chez la souris afin d'évaluer chez l'adulte les conséquences de l'absence des récepteurs muscariniques.
- 2) Déterminer l'impact d'un entraînement cholinergique sur la réactivité neuronale. L'utilisation de l'immunohistochimie permettra de mettre en évidence l'effet de l'induction d'une plasticité au niveau neuronal.

La combinaison de ces deux techniques permet de cartographier d'une part la population neuronale et leurs propriétés et d'autre part la nature des neurones dans les différentes couches corticales.

II. Résultats

II.1. Impact des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire de la souris

La transmission cholinergique joue un rôle déterminant dans le système nerveux central au niveau de la modulation de la mémoire, de l'attention, de l'apprentissage et de la plasticité neuronale. L'idée ici était de déterminer l'impact modulateur des récepteurs muscariniques sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel lors d'une présentation d'un stimulus visuel. Il est connu que le système cholinergique est impliqué dans la réorganisation des connectivités neuronales et que les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine sont impliqués dans les propriétés cellulaires du cortex visuel primaire. En effet, par son action sur la transmission neuronale corticale, l'ACh influe sur les neurones corticaux en modulant les réponses à des stimuli sensoriels.

L'étude consistait en une évaluation *in vivo* de l'organisation structurelle et fonctionnelle du cortex visuel primaire par la technique d'imagerie optique des signaux intrinsèques. Cette technique nous a permis d'évaluer les incidences de l'absence des récepteurs muscariniques sur la population neuronale globale. Il s'agit d'un article présentement en préparation. Pour cet article, j'ai effectué tout le protocole d'imagerie (préparation animale, imagerie intrinsèque), analysé les résultats obtenus ainsi qu'effectué les analyses statistiques et rédigé le manuscrit.

II.1.1. Impaired functional organization in the visual cortex of muscarinic receptors knock out mice

(Titre de travail)

(Article en préparation ; Journal visé : Cerebral Cortex)

Marianne Groleau¹, Matthieu Vanni¹, Hoang Nam Nguyen¹, Jürgen Wess², Christian Casanova¹ and Elvire Vaucher^{1*}

1. École d'optométrie, Université de Montréal, CP 6128 succursale centre-ville, Montréal, Qc, Canada

2. NIH-NIDDK, 8 Center Dr., Bethesda, MD 20892

Keywords : cartography, muscarinic receptors, visual cortex, cortical activity

ACKNOWLEDGMENTS

Grant sponsor: Canadian institute for health research; grant number: MOP-111003 (EV). Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; Grant number: 238835-2011 (EV). Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; Grant number: 194670 (CC). MG received financial support from the School of optometry and FRSQ Vision Research Network.

ABSTRACT

Acetylcholine is released in response to visual stimulation in the primary visual cortex and modulates the neuronal activity through muscarinic receptors and nicotinic receptors. It is also involved in the postnatal maturation of V1 induced by visual experience. The aim of this study was to examine the involvement of muscarinic receptors in the functional organization of the visual cortex using different strains of muscarinic KO and wild type mice. The visual cortex was imaged by optical imaging of intrinsic signals to obtain retinotopic maps. Spatial frequency and contrast selectivities in V1 were measured. Retinotopic maps along elevation and azimuth were measured using a continuous stimulation paradigm. Hemodynamic responses for full-field sine wave gratings were also analyzed and response amplitudes were put in relation with contrast and spatial frequency. Finally, to evaluate the specificity of the connectivity, the "scatters" of the phase were calculated. The visual field along elevation was increased in M2/M4-KO mice compared to WT but decreased in M1-KO. The deletion of M1 or the combination M1/M3 caused a decrease of the receptive field size. The absence of M2 and M4 mAChRs caused a decrease in the sharpness of neuronal connectivity (assessed by the scatter). Finally, in M1/M3- and M1-KO mice a decreased visual acuity is observed. These in vivo results demonstrate that the lack of mAChRs leads to an altered retinotopic map and a change in the functional organization of V1 but did not alter the structural organization of the visual cortex along the different KO mice tested.

INTRODUCTION

The cholinergic system is a neurotransmitter pathway involved in neuronal connectivity reorganization in the cerebral cortex (Aztiria et al., 2004) as well as in structural plasticity (Kilgard and Merzenich, 1998) and neuronal development (Hohmann and Berger-Sweeney, 1998, Lauder and Schambra, 1999). Acetylcholine (ACh) is released in the visual cortex following visual stimulation (Laplante et al., 2005, Collier and Mitchell, 1966) and modulates synaptic transmission. ACh can activate two major classes of receptors:

muscarinic (mAChR) and nicotinic (nAChR) receptors (for review, see Wess, 2004). nAChRs have been involved in feed-forward processing of specific stimuli through the facilitation of glutamatergic transmission at thalamo-cortical synapses (Gil et al., 1997). Inhibition of cortico-cortical connections by mAChRs has been shown to reduce feedback control from higher cortical areas (Gu, 2003, Roberts et al., 2005, Amar et al., 2010) and lateral spread of activation (Kimura et al., 1999, Silver et al., 2008). ACh also modulates GABAergic activity in the primary visual cortex (V1) (Zinke et al., 2006, Lawrence, 2008). Moreover, cholinergic transmission contributes to the neurobiological mechanisms of memory, attention, and learning but also to perception of sensory stimuli. In the primary visual cortex (V1), ACh influences cortical neuron responses to new visual stimuli. This contributes to attentional enhancement of specific visual stimuli processing and neuronal plasticity. A deficit in the cholinergic innervation of V1 leads to a decrease of the cortical responsiveness to visual stimuli (Dotigny et al., 2008). ACh also plays a role in structural plasticity in V1. For example, it can modulate the organization of the receptive fields (Delacour et al., 1990), the orientation selectivity of single cells and the orientation and direction selectivity of complex cells (Murphy and Sillito, 1987). The Knock Out (KO) rodent model is a very useful tool to study the synaptic pathway of the complete visual system. The properties of visual neurons in mice are similar in many ways to the ones found in other animal models (Drager, 1975, Niell and Stryker, 2008). Moreover, because mice possess associated areas and retinotopic cartography, they present an organized visual cortex and have been used to study the receptive field plasticity (Van den Bergh et al., 2010).

In the present study, we used these simple or double muscarinic KO mice to explore the contribution of M1, M2, M3 and M4 receptor on the visual system by using the optical imaging of intrinsic signals (OIS) technique. OIS has been widely used to visualize topographic maps such as orientation (Ts'o et al., 1990, Grinvald et al. 1986), ocular dominance (Ts'o et al., 1990, Haglund et al., 1993) or retinotopy maps in the visual system (Kalatsky and Stryker 2003, Schuett et al. 2002).

We found that mAChRs simple or double KO mice present alteration of their visual and neuronal properties. Indeed, we determined that M2 and/or M4 mAChRs are involved in the precision of cortical connection and that M1 and M3 are responsible for the size of the receptive fields. Moreover, M1, M2 and M4 mAChRs seem to be implicated in the formation of the visual field. Finally, the deletion of the different mAChRs did not affect the organizational properties of V1 (assessed here by the size and the form of the activated zone).

MATERIAL AND METHODS

Animal preparation

All procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals and were accepted by the Ethics Committee of the Université de Montréal. A total of 38 adult mice was used in this study, separated in five groups: M1/M3-KO (n=10), M1-KO (n=7), M2/M4-KO (n=8) and their respective controls (CTL1 (129SvEv-CF1, n=6); CTL2 (C57BL6, n=7)) Animals were maintained in a 12-h light/dark normal daylight cycle with *ad libitum* access to food and water. Mice were anesthetized with urethane (1.25g/kg, ip). Throughout the experiment, depth of anesthesia was periodically tested using the paw retirement reflex (additional doses were given if needed (10% of the induction dose)). A tracheotomy was performed and the animal was placed in a stereotaxic frame. A flow of pure oxygen was placed directly in front of the tracheal tube. In addition, xylocaine (0.2%) was injected locally to all incisions. The eyes were hydrated every 10-20 min. Core body temperature was maintained at 37°C using a feedback controlled heating pad and electrocardiogram was continuously monitored. The visual cortex was imaged through the skull, as an imaging chamber was placed over both hemispheres, glued on the skull, filled with agarose (1%) and sealed with a coverslip. At the end of the experiment, mice were killed by an injection of sodium pentobarbital (Euthanyl, i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde at room temperature.

Optical imaging

Stimulation

Visual stimulation was provided using a custom made software (STIMPlus) and presented by an LCD projector on a screen placed 20 cm in front of the mouse eyes (subtending 150x135 degrees of visual angle). Two types of stimulation were used: 1) To assess visuotopy and characterize maps and connectivity in V1, a continuous stimulation paradigm (Kalatsky and Stryker, 2003, Cang et al., 2008, Vanni et al., 2010b) was used where 2 deg light bars were periodically shifted horizontally (to obtain elevation maps) or vertically (to obtain azimuth maps) over a dark background at a frequency of 0.1 and 0.2 Hz. 2) To examine the functional properties of receptive field of V1's neurons, the amplitude of responses were measured as a function of contrast and spatial frequency selectivity. Episodic full-field sine wave gratings stimuli (four orientations: 0, 90, 180, 270 degrees) were presented during 2s and spaced by a blank presentation lasting 18s intervals (mean luminance 75cd/m²). For contrast sensitivity five contrasts were used: 6%, 12%, 25%, 50% and 100%. For spatial frequency selectivity, four frequencies were used: 0.005, 0.01, 0.02 and 0.04 cpd.

Acquisition

The cortex was illuminated at 545 +/- nm to adjust the focus of the camera and at 630 +/- nm to record intrinsic signals. Optical images were recorded using a 12 bits CCD camera (1M60, Dalsa, Colorado Springs, USA) driven by the Imager 3001 system (Optical Imaging Inc ©) and fitted with a macroscopic lens (Nikon, AF Micro Nikon, 60mm, 1:2.8D). Frames of 512x512 pixels were acquired at a rate of 4Hz, giving a spatial resolution of 28µm/pixel. Continuous acquisition lasted 10min. During episodic acquisition, frames were captured for 20 seconds, and this for every contrast and spatial frequency tested. An average of 10 repetitions was used to allow a better signal to noise ratio.

Data Analysis

OIS data were analyzed in MATLAB (MathWorks, Nattick, MA). For contrast and spatial frequency analysis, the responses for each trial and orientation were pooled. The amplitude of the negative responses were then calculated to each contrast and spatial frequency to construct tuning curves for each pixel. The spatial frequency producing the biggest response was calculated for each pixel and the average value of spatial frequency of all pixels of V1 was defined as the optimal spatial frequency. The curves of amplitude as a function of the contrast were modeled with a sigmoid to determine the contrast evoking 50% of the maximum response (see curve Fig X and Carandini et Sengpiel 2004). For the visuotopy analysis, a Fourier transform was performed for each pixel. The isolation of a precise frequency gives the magnitude of the cortical response and the phase which correspond to the relative retinotopy (Kalatsky and Stryker 2003). The regions of interest (ROI) of area V1 were manually determined without knowledge of the genotype. The shapes of these ROI were modeled with an ellipse and the ratio of the length/width was used as an index of ovality. The amplitude of the response at both, single and double frequency of the stimulation were measured and the ratio were used as an evaluation of the receptive field size of population of neurons (Vanni et al. 2010). In parallel, the phase of the response at the frequency of the stimulation was used to evaluate the visual field and accuracy. We calculate the proportion of visual field stimulation producing a cortical response by calculating the percentage of phase present in V1 (e.g. apparent visual field). To evaluate the accuracy of the retinotopy, a scatter index was calculated from the difference between the phase of a each pixel and its surrounding pixels (Cang et al., 2005, Cang et al., 2008).

Statistical analysis

Groups CTL1 (129SvEv-CF1), M1/M3-KO and M1-KO were compared using one-way ANOVA. Post-hoc test were carried out using LSD correction. CTL2 (C57BL6) and M2/M4- KO were compared using *t*-test.

Immunohistochemistry

After mice perfusion, brains were collected, post-fixed for 2 h in fresh fixative, and stored in 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.4) overnight. Brains were sliced into 35- μ m sections using a vibratome (Leica microsystems) at the level of the visual cortex/superior colliculus (-3.52 mm from Bregma). Serial brain sections were collected in 24-well plates, so that the AP level of the sections could be easily identified according to their position in the plate.

For each mouse, ten sections covering V1 were selected according to anatomical features. Sections were pre-incubated for 20 min at room temperature in phosphate buffer (PBS, 0.1 M, pH 7.4) containing 0.3% hydrogen peroxide, followed by 30 min in PBS containing 0.25% triton X-100 and 1.5% donkey serum. They were then incubated overnight at room temperature with rabbit-anti-ChAT (anticholine acetyltransferase) primary antibody (1:200, Chemicon, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) in PBS-triton. This was followed by 2 hr incubation in donkey-anti-rabbit secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PN, USA) and then for 1 hr in the avidin-biotin complex (ABC Elite kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). After each incubation step, rinses were carried out in PBS containing 0.25% triton. A peroxidase-substrate-kit Vector SG (Vector laboratories) was used to develop the reaction product during a standardized period of 5 minutes. Sections were then mounted onto slides, dehydrated and coverslipped with Permount™.

Stereological estimation of fibre density and varicosity

Stereological sampling and analysis were made in blind experimental conditions. Analysis was performed on 5 sections covering the primary visual cortex (-4.04 to -2.18 from Bregma). V1 (layers I to VI) was anatomically delineated at low magnification (10x) with reference to mouse brain atlas (Franklin & Paxinos, 2007). Stereological counting of varicosities and fibers was performed at 100x magnification (Leica HCX PL Fluotar oil-immersion objective) using Leica DMR microscope with Stereoinvestigator software (v 9.13, Microbrightfields VT) and a computer drive motorized stage. Optical-fractionator systematic sampling design was used to estimate the total number of varicosities. The

hemisphere spaceball probe was used to estimate fibre density (Mouton et al., 2002). V1 was systematically sampled with an average of 100 optical dissectors measuring $10 \times 10 \times 5 \mu\text{m}^3$. Guard zones were applied in all cases. At least 81 varicosities were counted per animal with an average of 169. The total estimations of varicosity numbers was calculated by the sum of the counted varicosity in the dissectors multiplied by the section sampling fraction multiplied by the area sampling fraction multiplied by the thickness-sampling fraction (Gundersen, 1986). A coefficient of error (CE) of the estimation is used to assess the precision of the sampling (Gundersen et al., 1999). Each of the measured mice CE was ≤ 0.1 which indicates adequate stereological sampling parameters (Mouton et al., 2002; Schmitz and Hof, 2005; West et al., 1991).

RESULTS

Using optical imaging of intrinsic signals and immunohistochemistry, we assessed visual properties and cholinergic innervation of V1 of muscarinic receptors KO mice compared to wt littermates.

Spatiotemporal properties

To explore the contribution of muscarinic receptors on the spatiotemporal properties of V1's RF, their spatial frequency selectivity, contrast sensitivity and size were evaluated from optical imaging measured. Firstly, the profile of the spatial frequency selectivity was assessed for the different groups of mice (Fig. 1). A shift to lower spatial frequency where observed for M1/M3-KO mice compared to CTL1 (ANOVA, $F_{2,20}=5.574$, $p=0.013$) but not for M1-KO mice. In comparison, no statistical difference were observed in the optimal spatial frequency between CTL2 and M2/M4-KO mice (t-test, $p=0.640$). Thus, M3 receptors could play a role in the development of high spatial frequency tuning of cells in V1. Contrast sensitivity was assessed at 4 spatial frequencies and 4 directions (Fig. 2). The C_{50} , which corresponds to the contrast evoking 50% of the maximal response, was not changed between CTL2 and M2/M4-KO (t-test, $p=0.900$). However, the C_{50} of M1/M3-KO

($p=0.003$) and M1-KO ($p=0.009$) were higher than CTL1 (ANOVA, $F_{2,17}=7.429$, $p=0.006$) suggesting an influence of M1 and possibly M3 receptors in the contrast discrimination.

To evaluate the size of population of RF (Fig. 3), the retinotopic maps were accessed with the continuous stimulation paradigm (Kalatsky et Stryker, 2003). At the frequency of the stimulation and the double frequency, it was possible to calculate maps of magnitude and phase. The ratio of magnitude of the first and second harmonics was recently proposed to be an indicator of the RF of underlying neurons (Vanni et al. 2010). A decreased of this ratio should correspond to an increase of the RF size. In M1-KO mice compared to CTL1, the index was smaller in azimuth (ANOVA, $F_{2,21}=4.191$, $p=0.031$) as well as in elevation (ANOVA, $F_{2,21}=3.565$, $p=0.048$). This suggests an increase of RF size in M1-KO mice without changes in their shape. Similarly, the index was decreased in M1/M3-KO along azimuth ($p=0.032$) but not along elevation compared to CTL1. No statistical significance was found along azimuth (t-test, $p=0.795$) between CTL2 and M2/M4-KO or along elevation (t-test, $p=0.622$). It was then proposed that M1 receptors could have an impact on the border of RF in area V1 which is coherent with the low spatial frequency shift observed before.

Influence of mAChR on the organizational properties of V1

The area of V1 was not affected by mAChR deletion

In parallel to the impact of muscarinic receptors on the functional characteristics of RF of area V1, we explore their effect on the functional organisation of area V1 (Fig. 3). Firstly, the cortical surface and shape allocated for the representation of the visual stimulation was evaluated. No statistical differences were observed for the area of V1 between CTL1, M1-M3-KO or M1-KO (ANOVA, $F_{2,22}=1.505$, $p=0.246$) neither between CTL2 and M2/M4-KO (t-test, $p=0.157$). To evaluate changes in the shape, the ratio of length of the two main axis of the area V1 were evaluated (Fig. 3). Also, there was no statistical differences for the index of ovality of V1 between CTL1, M1-M3-KO and M1-KO (ANOVA, $F_{2,21}=0.248$,

$p=0.783$) or between CTL2 and M2/M4-KO (t-test, $p=0.114$). Note that we used two distinct control groups given the genetic background difference between the KO mice line. This was a good decision since some features (visual field and scatter) were different between the two control groups (data not shown).

Functional organization of the adult visual cortex in mAChR KO mice

Secondly, the functional organisation of retino-geniculo-cortical projections was characterized by quantifying the field of view integrated in V1 (apparent visual field) and the spatial accuracy of these projections (scatter):

Apparent visual field representation is increased in M2/M4-KO mice

The apparent visual field was (Fig. 3) not altered along azimuth (ANOVA, $F_{2,22}=0.270$, $p=0.766$) between CTL1, M1/M3-KO and M1-KO nor along elevation (ANOVA, $F_{2,21}=3.382$, $p=0.055$), CTL1 (72.89 ± 4.25), M1-KO (58.39 ± 3.08 , $p=0.033$), M1/M3-KO (64.13 ± 3.14). Along azimuth, M2/M4-KO mice (44.03 ± 2.07) presented an increase of the apparent visual field compared to CTL2 (38.00 ± 1.23 , t-test, $p=0.031$) as well as in elevation CTL2 (53.96 ± 1.82) and M2/M4-KO (63.21 ± 3.01 , t-test, $p=0.025$). Taken together, these results suggest an antagonist effect of M1 vs. M2/M4 receptor on the visual field integration.

Alteration of the quality of the retinotopic maps in M2/M4-KO mice

To assess the accuracy of the retinotopic map, an index of the scatter was evaluated (see methods and Fig. 3). No changes in this index were found along azimuth (ANOVA, $F_{2,22}=0.155$, $p=0.858$) or elevation (ANOVA, $F_{2,21}=1.792$, $p=0.194$) between CTL1, M1/M3-KO and M1-KO. Along azimuth, M2/M4-KO mice (9.28 ± 0.77 , t-test, $p=0.041$) presented an increase of the scatter index compared to CTL2 (6.70 ± 0.83) but not along elevation ($p=0.859$) meaning that the retinotopic map accuracy can only be affected by M2/M4 receptors.

Anatomical correlates of V1

ChAT-related anatomical properties of V1

ChAT-stained fibres appear as fine lines (axons) of varying length and thickness with varicosities which are ellipsoid or round shaped dark swellings (puncta) present along the fibres (Fig. 4). The density of puncta hints the level of local volumetric transmission and neuronal interactions. The density of fibres and varicosities was quantitatively analysed and has revealed much variation between individuals, but not group-wise. Thus, no significant differences for fibres ($F(4)=2.764$, $p=0.056$) or varicosities ($F(4)=1.184$, $p=0.348$) was found.

DISCUSSION

Members of the muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are central to many physiological functions and it has been shown that neonatal visual deprivation affects the normal expression of muscarinic receptors in the primary visual cortex. In addition, an application of muscarinic antagonists in the visual cortex compromise cortical plasticity (Lauder and Schambra, 1999). Therefore, it was necessary to assess the impact of their deletion on visual capabilities adults. Using several simple or double muscarinic KO mice (M1-KO, M1/M3-KO and M2/M4-KO) Origlia et al. (2006) shown that muscarinic receptors can induce changes in V1 characteristics such as the reduction of long-term potentiation (LTP) is in M2/M4-KO mice and the switch from a long-term depression (LTD) to a in M1/M3-KO mice. Our results indicate that during embryogenesis, the muscarinic receptors are dispensable to the developmental processes dictating the organization of the visual cortex. Utilisation of optical imaging was a perfect way to correlate the implication of the muscarinic receptors with functional parameters that are measurable because it can combine functional mapping and characterization of properties of population of neurons and the immunohistochemistry analysis allowed us to associate anatomical features to functional properties. In this study, we found that M2 and M4 mAChRs are involved in the

precision of cortical connection even in the absence of cortical modifications as seen by ChAT labelling and that M1 and M3 are responsible for the size of the receptive fields. Moreover, M1, M2 and M4 mAChRs seem to be implicated in the formation of the visual field. Finally, the deletion of the different muscarinic receptors did not affect the organizational properties of V1.

Involvement of muscarinic receptors in the function of the primary visual cortex:

M1 and M3 mAChRs appear to be involved in the properties of V1's neurons since the contrast sensitivity is increased in M1- and M1/M3-KO mice and the optimal spatial frequency is decreased in M1/M3-KO mice. This strongly suggests a reduced sensitivity of the V1 neurons in KO mice.

It is known that neurons in primary visual cortex show changes in their sensitivity while adapting to contrast (Movshon and Lennie, 1979). Thus, our results concerning the contrast sensitivity could be related to the inhibitory function of M1/M3 mAChRs in corticocortical connections and the propagation of thalamocortical inputs through lateral connexions in V1 (Kimura and Baughman, 1997). Nevertheless, it could not be excluded that contrast adaptation could also occur in the retina (Kim and Rieke, 2001, Baccus and Meister, 2002). Indeed, the retina expresses the five subtypes of mAChRs (McBrien et al., 2001). However, it has to be mentioned that since we used adult transgenic mice and not selective pharmacological agents, it is possible that the changes we observed are caused, at least in part by adaptation phenomena. Nevertheless, the present study indicates that muscarinic receptors are involved in the organizational properties of the visual pathway during development.

Involvement of muscarinic receptors in the structural development of the primary visual cortex:

In the rodent cortex, the mAChRs are expressed at different levels, M1 being the major subtype followed in order by M2, M3 and M4 (Levey et al., 1991). We found that mAChRs

have clear impacts on functional organization of the primary visual cortex. Indeed, it has previously been demonstrated that the muscarinic receptors are implicated in plasticity and cortical development (Sillito and Kemp, 1983) and that, in mAChRs KO mice, *in-vitro* properties of the primary visual cortex related to long-term potentiation and depression are altered (Origlia et al., 2006).

Structural organization

The M2/M4 mAChRs appear to be involved in the connectivity of V1 since the scatter dispersion -an index of architectonic organization of the cortex- was altered in M2/M4 KO mice. This could be related to the inhibitory function of M2 autoreceptors on ACh release. Because of their presynaptic position, activation of M2/M4 mAChRs could reduce the probability of vesicular release (Rouse et al., 1999). The M2 receptor is predominant along axons instead of dendrites so its deletion produces an increase of cortical ACh release corticale (Zhang et al., 2002a, Disney et al., 2006). Indeed, in normal conditions, the presence of M2 receptors on GABAergic terminaisons inhibits the GABA release (Erisir et al., 2001, Salgado et al., 2007). This could cause an increase of cortical sensitivity (Sarter et al., 2005, Sarter and Parikh, 2005). Now, M2 being the major muscarinic receptor on cholinergic interneurons (Weiner et al., 1990, Levey et al., 1991), its absence could produce an increase of the lateralisation of the inputs which would lead to a larger and less precise connectivity (Salgado et al., 2007). This could explain why these pre-synaptic receptors affect the scatter.

Regarding the index of the size of the receptive fields, the results suggest that M1 and M3 mAChRs are essential to the adequate formation of receptive field. Cortical receptive fields are formed by precise thalamocortical projections (Buonomano and Merzenich, 1998) and ACh is involved in their modification and organization (Delacour et al., 1990). Our results suggest that M1 and M3 mAChRs appear to be involved in the lateral connectivity since in M1-KO and M1/M3 -KO mice, the receptive field size index is decreased. Indeed, it has

been shown that local application of ACh or AChRs agonists are can modify the receptive field properties of V1 neurons (Ashe et al., 1989, McKenna et al., 1989).

Finally, M1, M2 and M4 mAChR appear to be involved in the representation of thalamocortical inputs. The degree of representation of the stimuli (visual field) is decreased in M1-KO mice but increased in M2/M4-KO mice. This could be related to the pre-synaptic function of M1 which could reduce inhibitory lateral connections whereas the deletion of M2 and M4 mACh autoreceptors could produce an increase of the cortical release of ACh in the visual cortex (Mrzljak et al., 1996, Kimura and Baughman, 1997).

The lack of involvement of M3 mAChR in this phenomenon could arise from the fact that when M1 is deleted, ACh seems to have more affinity for M2 and M4 instead of M3 (Lazareno and Birdsall, 1995) but the deletion of a particular mAChR does not have an important impact over the expression of the other mAChRs (for review see (Wess, 2004). The action of Ach on M1 present on pyramidal cells or M2 mAChR on inhibitory interneurons have direct modulatory effects as shown by in vitro studies (McCormick and Prince, 1985). The similar density of fibres and varicosities observed in V1 suggests that the absence of muscarinic receptors do not induce structural changes in cholinergic innervation patterns. Furthermore, since the number of varicosities has been associated with neuronal activity level (Zhang et al., 2010, 2011), muscarinic knock-out mice seem to have a comparable level of neuronal activity.

CONCLUSION

In this study, we found that M2 and/or M4 mAChRs are involved in the accuracy of cortical connection and that M1 and M3 are responsible for the size of the the receptive fields. Moreover, M1, M2 and M4 mAChRs seem to be implicated in the formation of the visual field. Finally, the deletion of the different muscarinic receptors did not affect the organizational properties of V1 (assessed here by the size and the form of the activated zone). Studies on animals have shown that blocking muscarinic receptors have impacts on

the learning capacity (Torres et al., 1994, Baxter and Gallagher, 1996) and the cholinergic system have been shown to be involved in the attentional process in V1 (Roberts et al., 2005, Thiel et al., 2005). Thus, the present research may lead to further studies on the usefulness of pharmacological treatment to potentiate cholinergic processing of visual information in the visual cortex and allow proposing strategies that would improve rehabilitation cortical plasticity and recovery of visual abilities.

REFERENCES

Amar M, Lucas-Meunier E, Baux G, Fossier P (2010) Blockade of different muscarinic receptor subtypes changes the equilibrium between excitation and inhibition in rat visual cortex. *Neuroscience* 169:1610- 1620.

Ashe JH, McKenna TM, Weinberger NM (1989) Cholinergic modulation of frequency receptive fields in auditory cortex: II. Frequency-specific effects of anticholinesterases provide evidence for a modulatory action of endogenous ACh. *Synapse* 4:44-54.

Aztiria E, Gotti C, Domenici L (2004) Alpha7 but not alpha4 AChR subunit expression is regulated by light in developing primary visual cortex. *J Comp Neurol* 480:378-391.

Baccus SA, Meister M (2002) Fast and slow contrast adaptation in retinal circuitry. *Neuron* 36:909-919.

Buonomano DV, Merzenich MM (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual review of neuroscience* 21:149-186.

Cang J, Kaneko M, Yamada J, Woods G, Stryker MP, Feldheim DA (2005) Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron* 48:577-589.

Cang J, Wang L, Stryker MP, Feldheim DA (2008) Roles of ephrin-as and structured activity in the development of functional maps in the superior colliculus. *J Neurosci* 28:11015-11023.

Collier B, Mitchell JF (1966) The central release of acetylcholine during stimulation of the visual pathway. *J Physiol* 184:239–254.

Delacour J, Houcine O, Costa JC (1990) Evidence for a cholinergic mechanism of "learned" changes in the responses of barrel field neurons of the awake and undrugged rat. *Neuroscience* 34:1-8.

Dotigny F, Ben Amor AY, Burke M, Vaucher E (2008) Neuromodulatory role of acetylcholine in visually-induced cortical activation: behavioral and neuroanatomical correlates. *Neuroscience* 154:1607- 1618.

Drager UC (1975) Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 160:269-290.

Erisir A, Levey AI, Aoki C (2001) Muscarinic receptor M(2) in cat visual cortex: laminar distribution, relationship to gamma-aminobutyric acidergic neurons, and effect of cingulate lesions. *J Comp Neurol* 441: 168–185.

Gil Z, Connors BW, Amitai Y (1997) Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* 19:679-686.

Gu Q (2003) Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 80:291-301. Haglund MM, Ojemann GA, Blasdel GG (1993) Optical imaging of bipolar cortical stimulation. *Journal of neurosurgery* 78:785-793.

Gundersen HJ (1986) Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc.* 143, 3-45.

Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereologye reconsidered. *J. Microsc.* 193, 199-211.

Hohmann CF, Berger-Sweeney J (1998) Cholinergic regulation of cortical development and plasticity. New twists to an old story. *Perspect Dev Neurobiol* 5:401-425.

Kalatsky VA, Stryker MP (2003) New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38:529-545.

Kilgard MP, Merzenich MM (1998) Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science* 279:1714-1718.

Kim KJ, Rieke F (2001) Temporal contrast adaptation in the input and output signals of salamander retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:287-299.

Kimura F, Baughman RW (1997) Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77:709-716.

Kimura F, Fukuda M, Tsumoto T (1999) Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: possible differential effect depending on the source of input. *Eur J Neurosci* 11:3597-3609.

Laplante F, Morin Y, Quirion R, Vaucher E (2005) Acetylcholine release is elicited in the visual cortex, but not in the prefrontal cortex, by patterned visual stimulation: a dual in vivo microdialysis study with functional correlates in the rat brain. *Neuroscience* 132:501-510.

Lauder JM, Schambra UB (1999) Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1:65-69.

Lawrence JJ (2008) Cholinergic control of GABA release: emerging parallels between neocortex and hippocampus. *Trends in neurosciences* 31:317-327.

Lazareno S, Birdsall NJ (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors:

interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Molecular pharmacology* 48:362-378.

Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:3218-3226.

McBrien NA, Cottrill CL, Annes R (2001) Retinal acetylcholine content in normal and myopic eyes: a role in ocular growth control? *Visual neuroscience* 18:571-580.

McCormick DA, Prince DA (1985) Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:6344-6348.

McKenna TM, Ashe JH, Weinberger NM (1989) Cholinergic modulation of frequency receptive fields in auditory cortex: I. Frequency-specific effects of muscarinic agonists. *Synapse* 4:30-43.

Mouton PR, Gokhale AM, Ward NL, West MJ (2002) Stereological length estimation using spherical probes. *J. Microsc.* 206, 54-64.

Movshon JA, Lennie P (1979) Pattern-selective adaptation in visual cortical neurones. *Nature* 278:850-852.

Mrzljak L, Levey AI, Rakic P (1996) Selective expression of m2 muscarinic receptor in the parvocellular channel of the primate visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:7337-7340.

Murphy PC, Sillito AM (1987) Corticofugal feedback influences the generation of length tuning in the visual pathway. *Nature* 329:727- 729.

Niell CM, Stryker MP (2008) Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7520-7536.

Origlia N, Kuczewski N, Aztiria E, Gautam D, Wess J, Domenici L (2006) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. *J Physiol* 577:829-840.

Roberts MJ, Zinke W, Guo K, Robertson R, McDonald JS, Thiele A (2005) Acetylcholine dynamically controls spatial integration in marmoset primary visual cortex. *Journal of neurophysiology* 93:2062-2072.

Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI (1999) Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life sciences* 64:501-509.

Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L, Atzori M (2007) Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel modulation through activation of PI3K/Ca²⁺ - independent and PLC/Ca²⁺ -dependent PKC. *Journal of neurophysiology* 98:952-965.

Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* 48:98-111.

Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature reviews Neuroscience* 6:48-56.

Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813-831.

Sillito AM, Kemp JA (1983) Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain research* 289:143-155.

- Silver MA, Shenav A, D'Esposito M (2008) Cholinergic enhancement reduces spatial spread of visual responses in human early visual cortex. *Neuron* 60:904-914.
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134, 127-136.
- Tong XK, Hamel E (1999) Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92:163-175.
- Ts'o DY, Frostig RD, Lieke EE, Grinvald A (1990) Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging. *Science* 249:417-420.
- Van den Bergh G, Zhang B, Arckens L, Chino YM (2010) Receptive-field properties of V1 and V2 neurons in mice and macaque monkeys. *J Comp Neurol* 518:2051-2070.
- Vanni MP, Provost J, Casanova C, Lesage F (2010a) Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage* 49:1416-1431.
- Vanni MP, Provost J, Lesage F, Casanova C (2010b) Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *J Neurosci Methods* 189:138- 150.
- Vanzetta I, Grinvald A (2001) Evidence and lack of evidence for the initial dip in the anesthetized rat: implications for human functional brain imaging. *NeuroImage* 13:959-967.
- Vaucher E, Hamel E (1995) Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:7427-7441.

Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990) Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:7050-7054.

Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44:423-450.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482-497.

Xu X, Bosking WH, White LE, Fitzpatrick D, Casagrande VA (2005) Functional organization of visual cortex in the prosimian bush baby revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Journal of neurophysiology* 94:2748-2762.

Zhang ZW, Burke MW, Calakos N, Beaulieu JM, Vaucher E (2010) Confocal analysis of cholinergic and dopaminergic inputs onto pyramidal cells in the prefrontal cortex of rodents. *Front. Neuroanat.* 4, 21.

Zhang ZW, Kang JI, Vaucher E (2011) Axonal varicosity density as an index of local neuronal interactions. *PLoS One* 6, e22543.

Zinke W, Roberts MJ, Guo K, McDonald JS, Robertson R, Thiele A (2006) Cholinergic modulation of response properties and orientation tuning of neurons in primary visual cortex of anaesthetized Marmoset monkeys. *The European journal of neuroscience* 24:314-328.

Table 1. Stereological quantification of cholinergic fibers and number of varicosities on ChAT-immunostained mouse primary visual cortex

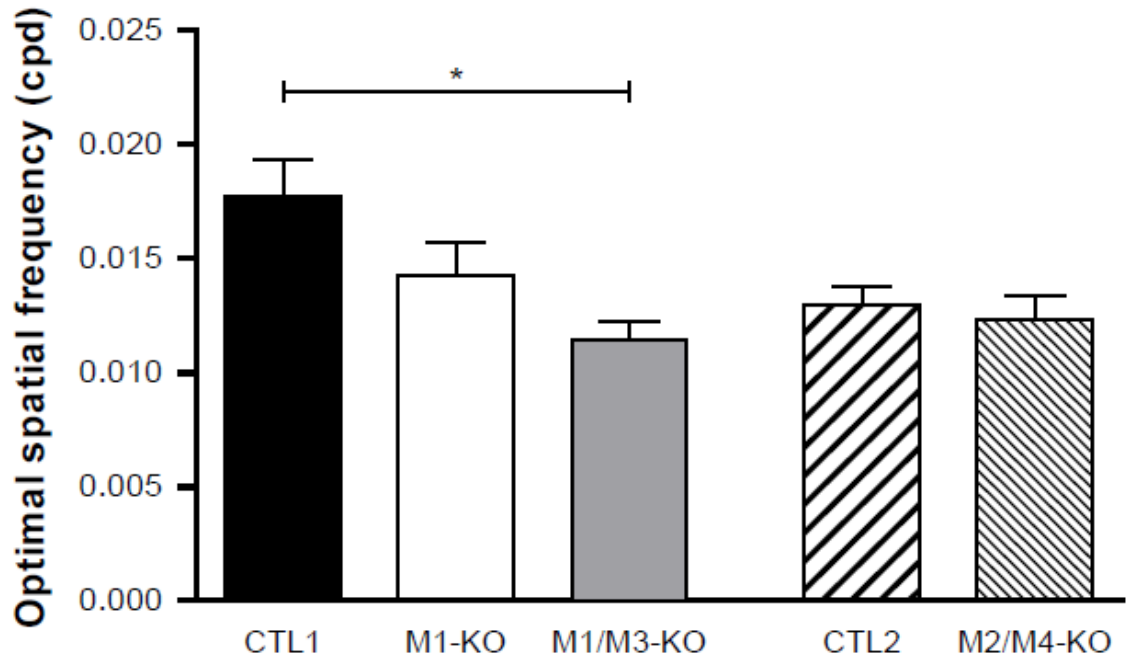
	CTL1	M1-KO	M1/M3-KO	CTL2	M2/M4-KO
Fibres length ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)*	1 504 086 \pm 258 750	1 634 838 \pm 242 977	1 232 320 \pm 156 225	1 245 572 \pm 128 866	1 302 584 \pm 343 855
Number of varicosities**	484 970 \pm 174 408	658 267 \pm 231 508	583 505 \pm 131 590	466 304 \pm 123 571	500 994 \pm 141 036

Both fibres and varicosities are shown as mean of the group \pm standard deviation

* $F_{2,24}=2.764$, $p=0.056$

** $F_{4,24}=1.184$, $p=0.348$

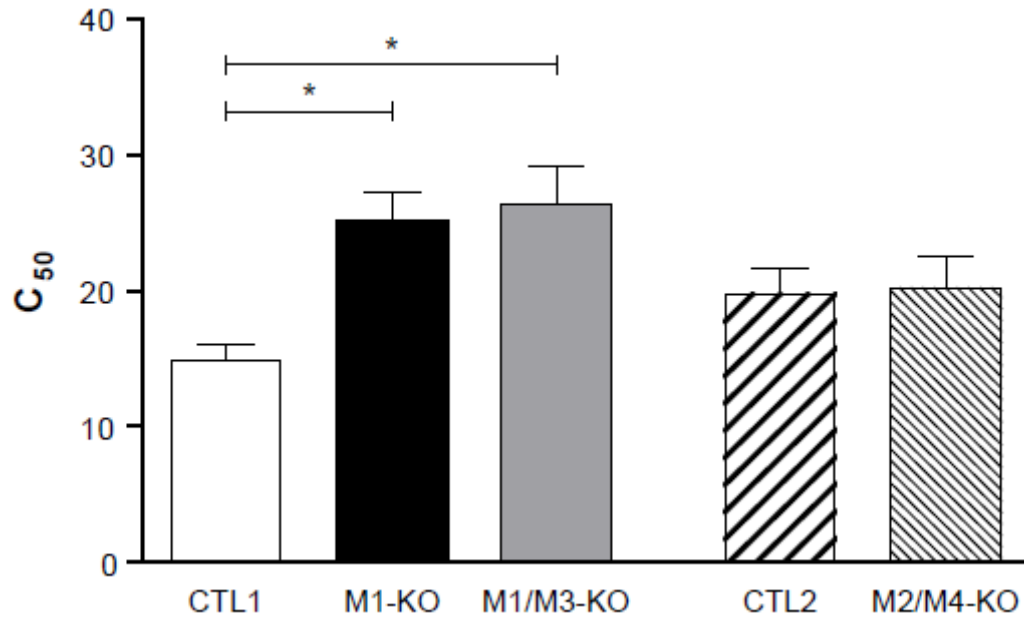
A.



B. Les courbes de sélectivité à la fréquence spatiale seront ajoutées ici

Figure 1. Evaluation of the optimal spatial frequency. For M1/M3-KO mice, the optimal spatial frequency was decreased compared to their controls. No statistical changes are observed when M2/M4-KO mice are compared to their controls. B. Example of the spatial frequency curve. Error bars represent \pm s.e.m. * $p < 0.05$

A.



B. Les courbes de sensibilité au contraste seront ajoutées ici

Figure 2. Evaluation of the C₅₀. A. Both M1/M3-KO and M1-KO mice presented an increase of the contrast evoking 50% of the maximal response. No statistical changes occurred in M2/M4-KO mice compared to their controls. B. Example of the contrast sensitivity curve. Error bars represent \pm s.e.m. * $p < 0.05$

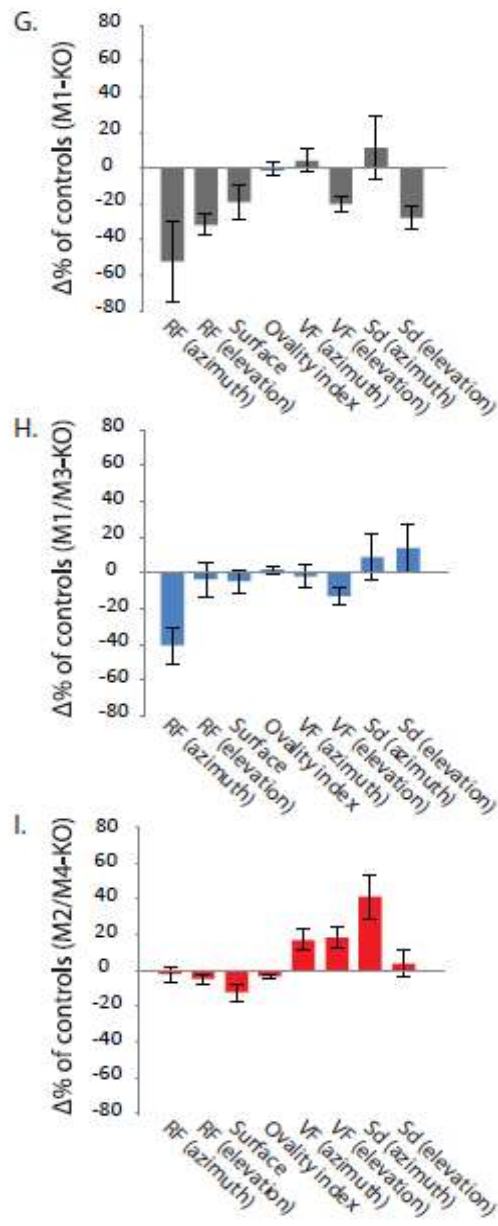
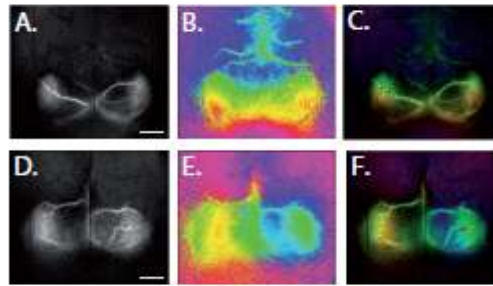


Figure 3. Organization of the KO visual cortex. A-C. Retinotopic map along elevation. **D-F.** Retinotopic map along azimuth. **G.** Properties of V1 of M1-KO mice. Along elevation and azimuth M1-KO mice presented a decrease of the receptive field size compared to controls. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors on the surface of the activated V1. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors concerning the shape of the primary visual cortex assessed by an ovality index. M1-KO mice presented a decrease of their apparent visual field compared to their control along elevation but not azimuth. There was no change of the apparent visual field or the scatter index. **H.** Properties of V1 of M1/M3-KO mice. Along azimuth, M1-KO mice presented a decrease of the receptive field size compared to controls. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors on the surface of the activated V1. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors concerning the shape of the primary visual cortex assessed by an ovality index. There was no change of the apparent visual field or the scatter index. **I.** Properties of V1 of M2/M4-KO mice. Along elevation and azimuth, M2/M4-KO mice presented no statistical differences concerning the receptive field size compared to controls. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors on the surface of the activated V1. There was no significant impact from the absence of the different subtypes of muscarinic receptors concerning the shape of the primary visual cortex assessed by an ovality index. M2/M4-KO mice presented an increase of the apparent visual field. Finally, M2/M4-KO mice presented an increase of the scatter index along azimuth but not elevation. Error bars represent \pm s.e.m. * $p < 0.05$

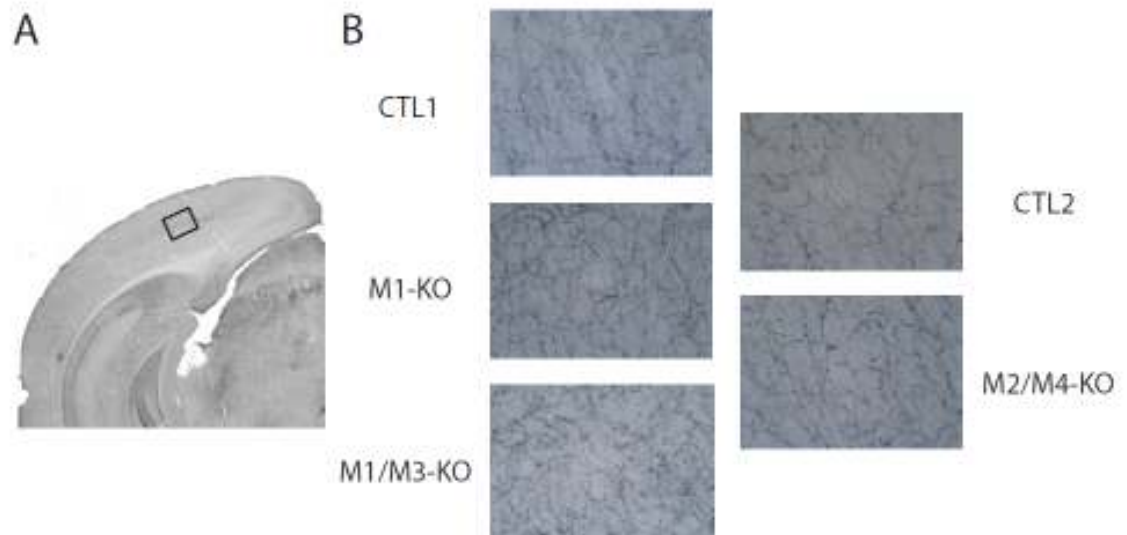


Figure 4. Cholinergic fibres and varicosities. A. Macroscopic view at 10x of sampled coronal brain section. B. ChAT-immunostained pictures of V1 layer IV cortices taken at 40x, the cholinergic pattern of innervation as well as the quality and quantity of cholinergic fibres and varicosities are visible.

II.1.2. Résultats supplémentaires

Il est à préciser que les deux souches contrôles utilisées dans le cadre de ce projet n'ont pas été combinées, et ce dû à des différences fondamentales dans l'organisation même du cortex visuel primaire. À titre indicatif, les animaux CTL1 (WT4) font office de contrôle pour les groupes M₁/M₃-KO et M₁-KO et CTL2 (C57) pour le groupe M₂/M₄-KO. La figure 5 montre bien les différences existant entre les deux souches contrôles utilisées lors des expériences. Un test-t a permis de confirmer des différences au niveau du champ visuel apparent ($p=0,001$) et au niveau du scatter ($p=0,005$). Les différences au niveau de l'index de la taille des champs récepteurs ($p=0,933$) et de l'ovalité ($p=0,352$) ne sont pas significatives. Au niveau de l'amplitude du signal, bien que le résultat ne soit pas significatif, il semble que les résultats pour les souris C57 soient légèrement plus élevés ($p=0,117$). Finalement, les animaux WT4 auraient tendance à avoir une plus grande surface de zone activée ($p=0,069$), mais encore une fois, ce n'est pas significatif. C'est la raison pour laquelle les groupes contrôles n'ont pas été combinés et que les différents groupes KO ne peuvent être tous comparés entre eux. En effet, il est rapporté que différentes lignées de souris peuvent présenter des modifications de leurs acuités visuelles (Wong and Brown, 2006).

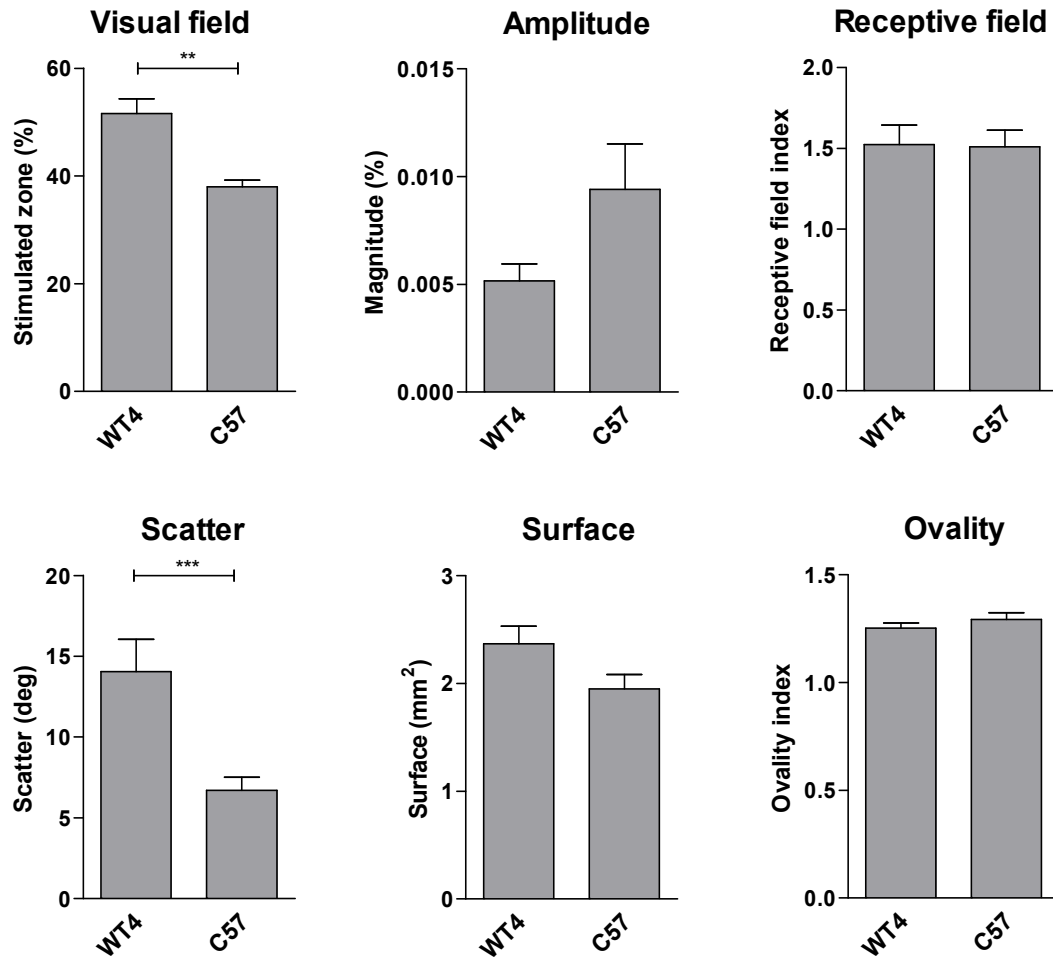


Figure 5. Différences entre les souches contrôles utilisées. Deux paramètres présentent des différences entre les lignées témoins : Le champ visuel (visual field) et l'index de scatter. L'amplitude, la taille des champs récepteurs (receptive field). La surface et l'index d'ovalité sont similaires chez les deux groupes.

II.1.3. Technique d'imagerie : description détaillée

Préparation animale

Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité de Protection des Animaux de l'Université de Montréal. Cinq échantillons de souris (mâles uniquement) ont été testés (toute souris ayant le phénotype albinos a été exclue) : 6 souris témoins (Wild Type (129SvEv-CF1) pour les M1/M3-KO et M1-KO). 7 souris témoins (Wild Type (C57BL/6NTac) pour les M2/M4-KO). 8 souris Knock Out (KO) *M2/M4*^{-/-} provenant du laboratoire Wess, pour lesquelles les récepteurs muscariniques 2 et 4 ont été éliminés. 10 souris Knock Out (KO) *M1/M3*^{-/-} provenant du laboratoire Wess, pour lesquelles les récepteurs muscariniques 1 et 3 ont été éliminés. 7 souris Knock Out (KO) *M1*⁻ provenant du laboratoire Wess, pour lesquelles le récepteur muscarinique 1 a été éliminé.

Chaque souris est anesthésiée à l'uréthane (injection intra-péritonéale : concentration de 2g/kg provenant d'une solution 10%). Des injections subséquentes sont administrées au besoin (réflexe de retrait de la patte, pincement de la queue, mouvement des vibrisses, mouvement des yeux ou des paupières). Afin d'améliorer la physiologie animale et de diminuer la détresse respiratoire, une trachéotomie est effectuée (Moldestad et al., 2009) à l'aide d'un cathéter (20GA 1.16 IN) maintenu en place à l'aide d'un fil et d'une goutte de colle à tissus, qui referme par la même occasion l'incision sub-trachéale. Ensuite, la souris est installée dans un cadre stéréotaxique où le champ visuel est dégagé. L'animal respire de lui-même, toutefois, un flot constant d'oxygène humidifié est dirigé vers le tube trachéal. Les yeux de l'animal sont hydratés à l'aide de larmes artificielles (Blink) afin de limiter l'opacification cornéenne toutes les 10-20min. Si toutefois une opacification est observée, l'animal est laissé au repos avec une hydratation accrue des yeux, et normalement le phénomène est réversible. Les battements cardiaques et la température de l'animal sont monitorés tout au long de la journée d'expérimentation.

Imagerie optique des signaux intrinsèques

La peau au dessus du crâne est ouverte, mais puisque les vaisseaux sanguins du cortex sont visibles par transparence du crâne, aucune craniotomie n'est performée au niveau de V1 (contrairement aux autres animaux dont l'épaisseur du crâne est plus grande) (Fig. 9). Afin d'éviter le dessèchement de l'os, ce qui opacifierait la préparation, de l'huile de silicone est utilisée dès que l'incision est pratiquée. Une chambre ronde de métal est ensuite installée au dessus de V1 et maintenue en place à l'aide d'une goutte de colle à tissus. Elle est ensuite remplie d'agarose 1% puis scellée à l'aide d'une lamelle, ce qui permet d'avoir une surface plane. Le cortex est illuminé à l'aide de fibres optiques. Tout d'abord à 545nm (lumière verte), qui permet à la caméra CCD (Charge Coupled Device) de faire le focus sur les vaisseaux sanguins. Une fois cette étape faite, la caméra est défocussée d'environ 500µm, ce qui permet théoriquement d'aller chercher la couche IV du cortex visuel (toutefois, il faut savoir que l'imagerie optique des signaux intrinsèques ne permet pas de séparer et d'acquérir les données dans une seule couche corticale, mais intègre les réponses des différentes couches). L'acquisition se fait via Imager 3001 (Optical Imaging Inc.).

À la fin de chaque expérience, l'animal est euthanasié par injection intra-cardiaque de paraformaldéhyde 4%, ce qui permet de fixer les tissus afin de pouvoir les utiliser subséquemment. Le cerveau de chaque animal est prélevé et post-fixé *over-night*.

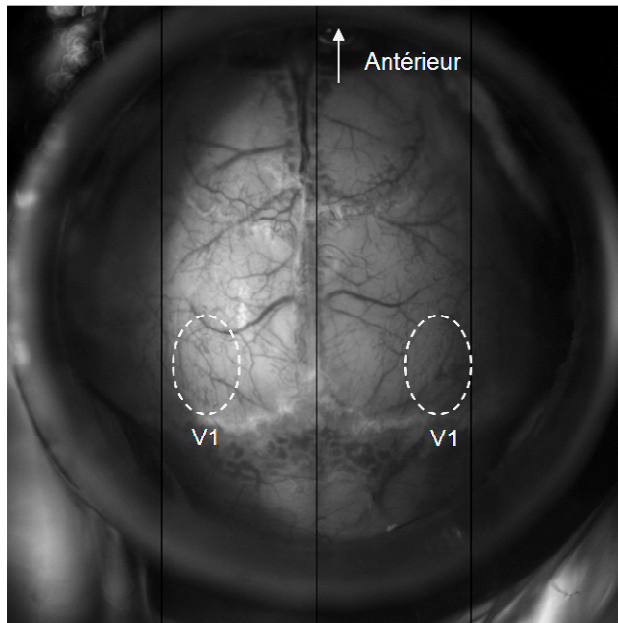


Figure 6. Visualisation des vaisseaux par transparence du crâne.

Une chambre d'imagerie est positionnée au dessus du crâne, remplie d'agarose 1% et scellée.

Stimulations visuelles

Différentes stimulations visuelles ont été présentées à l'animal durant la journée d'expérimentation. Le logiciel Stimplus (logiciel maison du laboratoire du Dr Casanova) a été utilisé pour créer et présenter les stimuli.

Réponses hémodynamiques

Le paradigme de stimulation épisodique décrit dans l'introduction est employé pour évaluer la sensibilité aux contrastes et la sélectivité à la fréquence spatiale.

Sensibilité aux contrastes

Le stimulus consistait en un réseau sinusoïdal présenté durant 2 secondes précédé et suivi de phases de non stimulation respectivement de 5 secondes et 13 secondes. Quatre orientations sont présentées : 0°, 90°, 180° et 270° et chacun des 5 contrastes est représenté à cette orientation : 6%, 12%, 25%, 50% et 100%. De plus, un blank est utilisé dans chaque test, c'est-à-dire qu'au lieu des 2 secondes de stimulation, le gris uniforme (75cd/m^2) des

phases pré et post-stimulation est utilisé. L'analyse est faite sur 10 répétitions de ces 21 conditions. L'analyse de la sensibilité au contraste nous permet de déterminer le C_{50} , c'est-à-dire le contraste qui permet d'obtenir 50% de la réponse neuronale optimale. Il s'agit d'une quantification de l'amplitude de la réponse neuronale où la réponse maximale (par rapport au blank) correspond à 100%. Plus le C_{50} obtenu est élevé, plus la discrimination des faibles contrastes est pauvre, et plus le C_{50} est faible, plus la discrimination aux faibles contrastes sera supérieure.

Sélectivité à la fréquence spatiale

Le stimulus consistait en un réseau sinusoïdal présenté durant 2 secondes précédé et suivi de phases de non stimulation respectivement de 5 secondes et 13 secondes. Quatre orientations sont présentées : 0° , 90° , 180° et 270° et chacune des 4 fréquences spatiales est représentée à chaque orientation : 0.05, 0.1, 0.2 et 0.4 cpd. De plus, un *blank* est utilisé dans chaque test, c'est-à-dire qu'au lieu du 2 secondes de stimulation, le gris uniforme (75cd/m^2) des phases pré et post-stimulation est utilisé. L'analyse est faite sur 10 répétitions de ces 17 conditions. L'analyse de la sélectivité à la fréquence spatiale nous permet de déterminer la fréquence spatiale optimale, c'est-à-dire la fréquence pour laquelle la réponse neuronale est à son maximum. Nous pouvons ainsi déterminer l'acuité visuelle de l'animal.

Rétinotopies

La stimulation périodique (voir introduction) a été utilisée pour tester ce paramètre. Une barre claire (2° d'angle visuel) sur un fond contrasté est présentée. La barre est présentée verticalement afin de tester l'azimut (vers la gauche ou vers la droite) ou horizontalement afin de tester l'élévation (vers le haut ou vers le bas). Deux fréquences temporelles ont été utilisées afin d'optimiser la réponse neuronale et d'ainsi déterminer la fréquence préférée : 0,1 et 0,2 Hz. Les cartes rétinotopiques nous permettent de quantifier une pléiade d'informations. Elles sont obtenues en combinant deux cartes. Une carte d'amplitude, qui correspond à l'activité neuronale et où les portions claires correspondent aux zones activées,

et une carte de phase, qui permet d'observer l'activation des différentes populations de neurones en fonction du temps (Fig. 10). Les régions d'intérêt ou ROI ont été délimitées manuellement.

Surface de la ROI

Il s'agit de la taille (ou aire) de la ROI.

Index d'ovalité

L'index d'ovalité permet de déterminer la forme de V1. Il s'agit du rapport hauteur de la ROI sur sa largeur. Si l'index se rapproche de 1, alors V1 est de forme ronde, plus l'index s'en éloigne, plus V1 sera de forme ovoïde.

Ratio des harmoniques

Suite à la transformation de Fourier du signal, nous obtenons le spectre de la réponse et le ratio 2^e/1^e harmonique donne un indice de la taille des champs récepteurs (Vanni et al., 2010).

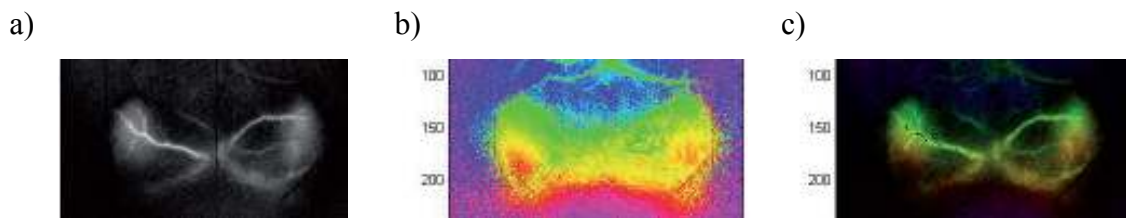


Figure 7. Obtention d'une carte rétinotopique La combinaison d'une a) carte d'amplitude de la réponse et d'une b) carte de phase produit une c) carte rétinotopique.

Index du scatter

Cet index a été utilisé par l'équipe de Cang afin de mesurer la finesse des connectivités neuronales. Plus l'index est faible, plus la transition entre les couleurs de la carte de phase sera progressive et plus fines seront les connexions. Plus l'index augmente, plus la transition entre ces couleurs sera pixellisée (Cang et al., 2005a, Cang et al., 2005b, Cang et al., 2008a).

Champ visuel apparent

Il s'agit ici de l'observation de l'éventail de couleurs visibles sur la carte rétinotopique. Moins il y a de couleurs, plus le champ visuel est réduit.

II.2. Induction à long-terme d'une augmentation de la réactivité neuronale dans le cortex visuel du rat suite à un entraînement visuel couplé à une stimulation cholinergique

Le système cholinergique est impliqué dans la plasticité du cortex cérébral par des phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme, ainsi que par la réorganisation des connectivités neuronales. Il est connu qu'une relâche d'ACh dans le cortex visuel est observée suite à une présentation d'un stimulus visuel. De plus, l'inactivation des projections du télencéphale basal vers V1 induit une réduction de l'immunoréactivité c-Fos. L'objectif était ici d'évaluer les effets à long-terme d'un entraînement visuel couplé à une stimulation du télencéphale basal sur la nature des neurones immunoréactifs au c-Fos, c'est-à-dire les neurones activés. En effet, des études préliminaires effectuées dans le laboratoire du Dr. Vaucher ont permis de déterminer que le couplage des stimulations visuelles répétées à l'entraînemant cholinergique pouvait modifier le comportement animal, notamment au niveau de l'acuité visuelle. Puisque cette combinaison est en mesure de produire des modifications comportementales, il devenait intéressant d'évaluer l'influence de l'ACh sur la plasticité corticale et de s'attarder aux modifications neuroanatomiques et de déterminer quels éléments de l'équilibre excitateur/inhibiteur sont compromis chez ces animaux. J'ai donc procédé à l'immunohistochimie du cortex visuel primaire afin de détecter les modifications neuronales chez les animaux entraînés, compté les cellules marquées et analysé les données obtenues. J'ai rédigé pour l'article la portion de matériel et méthode ainsi que les résultats en plus d'avoir discuté avec l'auteur principal de l'étude pour et contribué à la discussion.

Il s'agit de résultats qui sont incorporés à l'article Visual training paired with electrical stimulation of the basal forebrain improves orientation selective visual acuity in the rat, qui

a été soumis à la revue *Cerebral Cortex* (voir plus particulièrement les éléments se rapportant à la figure 5 de l'article).

II.2.1. Visual training paired with electrical stimulation of the basal forebrain improves orientation selective visual acuity in the rat.

(Cerebral Cortex, soumis)

Jun Il Kang^{1,2}, Marianne Groleau¹, Florence Dotigny¹, Hugo Giguère¹ and Elvire Vaucher^{1*}

1. École d'optométrie, Université de Montréal, CP 6128 succursale centre-ville, Montréal, Qc, Canada
2. Département de Physiologie, Université de Montréal, CP 6128 succursale centre-ville, Montréal, Qc, Canada

Abbreviated title: Visual/cholinergic training for visual learning

ACKNOWLEDGMENTS

Grant sponsor: Canadian institute for health research; grant number: MOP-111003 (EV). Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; Grant number: 238835-2011 (EV). JIK and MG received financial support from the School of optometry and FRSQ Vision Research Network. We are profoundly grateful to Annie Tang and Lodz Timmer for their helpful technical assistance in this work.

ABSTRACT

The aim of this study was to improve perception of selective orientation in awake adult rats by coupling a visual-training regimen with stimulation of the cholinergic system of the basal forebrain. Visual acuity, as measured using a visual water maze, increased after two weeks of visual training coupled with basal forebrain electrical stimulation. This increase in visual acuity was not observed when visual training or basal forebrain stimulation were performed alone nor when cholinergic fibers were selectively lesioned prior to stimulation. Long-lasting increase in cortical reactivity of the primary visual cortex was measured by field potential recording and immunocytochemistry after coupled visual/cholinergic training and involved both excitatory and inhibitory transmission. These findings demonstrate that when coupled to visual training the cholinergic system may enhance cortical plasticity in V1 by changing the balance of excitatory/inhibitory neurotransmission, thus resulting in perceptual learning. This study opens the possibility of establishing efficient rehabilitation strategies for facilitating visual recovery.

INTRODUCTION

Improving visual capacity through training and perceptual learning has the potential to be a powerful method for repairing partial vision deficits or visual impairment in adults. Studies investigating this strategy have suggested a strong role for attentional mechanisms and cortical plasticity in rehabilitation (Sabel et al., 2011). Basal forebrain (BF) cholinergic afferents in the primary visual cortex (V1) play a key role in visual attention and cortical plasticity (Bear and Singer, 1986; Greuel et al., 1988; Kang and Vaucher, 2009). We have recently suggested that this system contributes to visual learning in adult rats (i.e. acquired experience-dependent plasticity). Acetylcholine (ACh) facilitates the processing of novel/relevant stimuli by modulation of the efficiency of thalamo-cortical and cortico-cortical inputs in V1. This plays a key role in visual attention processes (Herrero et al., 2008). In particular, feed-forward processing of specific stimuli is prioritized due to

facilitation of glutamatergic transmission of thalamo-cortical synapses by nicotinic receptors (nAChR) (Gil et al., 1997) and inhibition of cortico-cortical connections by muscarinic receptors (mAChR), which reduces feedback control from higher cortical areas (Gu, 2003; Roberts et al., 2004; Amar et al., 2010) and lateral spread of activation (Kimura et al., 1999; Silver et al., 2008). ACh also modulates GABAergic activity in V1 (Zinke et al., 2006). In addition, cholinergic activation elicits long-term increase in V1 neuronal responses when transiently associated with visual stimulation (Kuczewski, 2005; Kang and Vaucher, 2009). These effects associated with long term potentiation (LTP)-like mechanisms and synaptic plasticity, result in cortical plasticity and learning (Rokem and Silver, 2010). Finally, it has been shown that ACh is involved in cortical plasticity through its ability to control the balance between excitatory and inhibitory transmission in V1 (Lucas-Meunier et al., 2009; Yazaki-Sugiyama et al., 2009). This is, for example, the neuronal substrate for the regulation of cortical plasticity by the plasticity brake, *lynx1* (Morishita et al., 2010). Together, these results suggest that the cholinergic system induces a long-lasting enhancement in the efficacy of processing selected visual stimuli.

To determine if the functional changes induced by the cholinergic system could result in perceptual learning, particularly during a visual rehabilitation paradigm, a 14-day visual training to a weak visual stimulus (30° sine-wave grating) was coupled to electrical stimulation of the BF in awake adult rats. The enhancement of the visual acuity to this specific orientation was tested using the visual water maze (Prusky et al., 2000; Dotigny et al., 2008) and long-term cortical responsiveness for this stimulus was measured by *in-vivo* field potential recordings. Changes in the functional architecture of visual cortex were quantified by counting the number and layer specificity of activated neurons immunolabeled for c-Fos. Finally, the neurochemical nature of these activated neurons was identified to investigate whether excitatory (i.e., glutamatergic) or inhibitory (i.e., GABAergic) neurons were involved in this response. Our data suggest that concomitant stimulation of the visual and cholinergic systems, a paradigm that could be used for vision

recovery strategies, induced a permanent upregulation of cortical responses in V1 leading to improved visual performance.

MATERIAL AND METHODS

Animal preparation

Adult Long-Evans rats (n=71, 200-225 g) were obtained from Charles River Canada (St-Constant, Quebec, Canada) and were maintained in a 12-h light/dark normal daylight cycle with *ad libitum* access to food and water. Visual acuity, visual evoked potentials (VEP) and neuronal activity were measured after visual/sham training coupled or not with BF stimulation. Each experiment had six components: a pre-training visual acuity behavioral test, electrode implantation, a visual/sham training that was either coupled or uncoupled to BF stimulation, a post-training visual acuity behavioral test, VEP recordings, and perfusion/immunostaining (Fig. 1). BF stimulation was performed in the horizontal limb of the diagonal band of Broca (HDB) because this nucleus provides the majority of the cholinergic innervation of V1 (Gaykema et al., 1990; Laplante et al., 2005). The behavioral test consisted of measuring the visual acuity of the rat for a 30°, 150° or a 0° sinusoidal grating compared with a gray screen using the visual water maze (Prusky et al., 2000; Dotigny et al., 2008). The visual/sham training lasted for 14 days and consisted of presenting the rat equal luminance images of the sinusoidal grating and the gray screen for 10 min/day. After the pre-training behavioral test and electrode implantation, the rats were divided randomly into eight groups: control (n=7), sham training/no HDB stimulation; VS (n=9), 30° sinusoidal grating presentation training/no HDB stimulation; HDB (n=8), sham training/HDB stimulation; VS/HDB (n=8), 30° visual training/HDB stimulation; VS/HDB/Sap (n=4), 30° visual training/HDB stimulation/IgG saporin injection in HDB prior to training; VS/HDB/SapV1 (n=6), 30° visual training/HDB stimulation/IgG saporin injection in V1 prior to training; and VS/HDB/Sco (n=4), 30° visual training/HDB stimulation/scopolamine intraperitoneal injection during the post-training behavioral test. Orientation specificity was further tested in VS/HDB/150 (n=7), in which pre- and post-

training visual acuity was tested using a 150° orientation grating – with equal salience than 30° orientation grating - but the visual training was performed using a 30° orientation and VS/HDB/0 (n=4), in which pre- and post-training visual acuity as well as visual training were tested using a 0° orientation (see Fig. 1, Table 1). The guidelines set by the Canadian Council for the Protection of Animals were followed for all procedures and approved by the local Animal Care Committee, “Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux” at the University of Montreal (protocol # 10-133). All efforts were made to minimize suffering and the number of animals used for these experiments.

Visual water maze testing

As described previously, to test visual acuity and discrimination ability, the rats were trained and tested in a visual water maze, a forced choice, water-based visual discrimination task with two alternatives (Prusky et al., 2000; Dotigny et al., 2008). The task consisted of associating a submerged platform with the positive stimulus, a sinusoidal grating (0.12 cpd, 90% contrast), but not the negative stimulus, a gray screen with equal luminance to the positive stimulus. Given the larger number of cells in V1 with a preference for a 0° orientation compared to a 30° orientation stimulus (Girman et al., 1999), pilot experiments were performed to determine whether visual acuity was better in discriminating a horizontal (0°) grating from a gray screen compared to discriminating a diagonal grating (30°) from a gray screen. This was tested in additional groups of rats (n= 6 for each group). For the main objective of this study, the rats were tested for their ability to discriminate a 30° orientation sinusoidal grating from a gray screen during the pre- and post-training periods. The orientation noted as 0° corresponds to the horizontal bar and the angle increases counterclockwise to 90° as represented by the vertical bar.

As described previously, behavioral analysis consisted of three phases: pre-practicing, practicing, and testing (Prusky et al., 2000). Increases in the spatial frequency of the stimulus (from 0.12–0.9 cpd) were made between blocks of trials until the ability to distinguish the grating from gray screen approached the frequency expected by chance

(<70%). As the animal approached threshold frequencies (0.5– 0.9 cpd), the rats were then required to have five consecutive, correct trials or be correct in 7 out of 10 trials. A more detailed explanation about each phase may be found in our previously published study (Dotigny et al., 2008). Using this method of limits (Prusky et al., 2000), the testing phase can be completed in 2–3 days (40 trials/days). The last spatial frequency that the rat succeeded in discriminating was considered to be its visual acuity.

Electrode implantation and surgery

After the pre-training test, appropriate animals were prepared for electrical stimulation of the HDB, cholinergic neurons specific lesion and VEP recording. Animals were anesthetized with isoflurane (induction 5%, maintain 3%) and placed in a stereotaxic apparatus. Throughout the experiment, the rectal temperature was maintained at 37°C using a thermostatically controlled heating pad (FHC, Bowdoinham, ME, USA). A dental drill was used to make a hole (0.13 mm in diameter) in the skull above the left visual cortex for VEP recording and above the HDB for chronic electrode implantation and lesion of the neurons. An electrode guide (polyurethane tubing) was then inserted above V1 (mm from Bregma: AP -7.5, ML +4.0, DV 0). The tungsten-stimulating electrode denuded at each tip was implanted in the HDB ipsilateral to the cortical recording site (mm from Bregma: AP -0.3, L +2.0, DV -9.0). In the case of the cholinergic system lesioned group, the animals received unilateral intracortical injection (0.5 µl) of 192-IgG sap (Advanced Targeting System, San Diego, CA, USA; 0.075 µg/µl) at the location where the electrode was implanted (HDB). Two stainless steel screws (Small parts, Miami Lakes, FL, USA) were screwed into the skull, then the guides and the HDB implanted electrode were secured with dental cement. After suturing the incised skin, local anesthesia (xylocaine 2%, Astra Zeneca, Mississauga, Canada) was topically administered to the wound, and the animals were returned to their cages. An anti-inflammation agent, carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg), was injected s.c. to reduce pain. The area where the electrode was implanted was identified by electrical lesion after the last VEP recording and confirmed by cresyl violet staining of

fixed brain sections. The location of the sites where the electrodes were implanted, were identified in coronal sections at the level of the HDB using a Leica DMR microscope.

Pairing visual/sham training with HDB electrical stimulation

The visual/sham training paradigm was designed to examine whether the selective orientation response could be modified through visual training of a specific pattern and/or through cholinergic neuron stimulation. To this end, awake rats were restrained for 10 min a day for 14 days with their heads fixed in a frame surrounded by two lateral monitors and an additional monitor facing the rat 21 cm away from its eyes (Fig. 1). The visual stimulus was generated using Vpixx software (v 2.79, VPixx technologies Inc., Saint-Bruno, Quebec, Canada) and displayed on three monitors (LG, luminance 37 cd/m²). The stimulus was either a sine-wave grating (0.12 cycle/degree, orientation 30°, phase converting at 1 Hz) for the VS, VS/HDB, VS/HDB/Sap and VS/HDB/Sco groups or a gray screen for the CTL and HDB groups. Training was performed daily at the same time in the morning for each rat.

HDB electrical stimulation

Electrical stimulation started at the beginning of the visual stimulation period and was delivered over the 10 min (train of pulses 100 Hz, 0.5 ms, 50 μ A, 1 sec on/1 sec off, Pulsemaster A300, WPI, Sarasota, FL) through an isolation unit (WPI 365, WPI, Sarasota, FL). This paradigm of electrical stimulation in the HDB has been designed to activate cholinergic system rather than GABAergic system (Vaucher et al., 1997; Kang and Vaucher, 2009).

VEP recording procedure

VEPs were recorded to assess the effect of visual/sham training and HDB stimulation on field potential cortical responses. Two days after the last session of the behavioral test, the rats were placed in the dark in the stereotaxic frame under anesthesia (isoflurane, induction

5%, maintenance 1.5%). The polyurethane tubing (electrode guide) was removed, leaving a hole in the dental cement over V1 through which the electrode was inserted. The electrode was placed 0.5 mm below the dura. To normalize VEP recordings, 20 baseline field potentials in response to a gray screen (0 CPD) were recorded for 10 minutes before eliciting evoked responses and the peak-to-peak amplitude between 0.2-0.4s was averaged. This time-window corresponds to the cortical response with visual stimulus. As described previously (Kang and Vaucher, 2009), VEPs were calculated by averaging 20 electrical responses of extracellular field potentials over the 10-min stimulation period (trains of 100-msec visual stimuli, 0.03 Hz). The signal-to-noise ratio was obtained by dividing the amplitude (difference between the negative peak and the positive peak) of the VEPs (signal) by the amplitude of the baseline signal (noise). Evoked responses were elicited by diagonal sine-wave gratings (orientation 30°, contrast 90%, 0.12 cycle/deg) identical to that used during visual training and were displayed on a computer monitor (30x25 cm, Titanium; luminance 21 cd/m²; Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) placed parallel to the midline of the rat at a distance of 30 cm (Girman et al., 1999; Laplante et al., 2005). Between each grating, the computer screen displayed a neutral gray stimulus with the same mean luminance. Evoked responses were amplified (5,000X), filtered at 3 Hz ~ 1 kHz (Grass Inc, West Warwick, RI, USA) and collected with the MP100 data acquisition system and Acknowledge software (v 3.8; Biopac system Inc., Goleta, CA, USA). To maximize c-Fos expression, the rats were kept in the dark for 20 minutes, and another session of visual stimulation (10 min) was performed followed by an additional 30 minutes of dark before they were perfused.

Immunohistochemistry

The rats were then deeply anesthetized with pentobarbital (54 mg/kg body weight i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde at room temperature. After perfusion, the brains were harvested, post-fixed for 2 h in fresh fixative, and stored in 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 7.4) overnight. To visualize V1, the brains were sliced into 35- μ m sections using a vibratome (Leica microsystems) at the level of the visual

cortex/superior colliculus (mm from Bregma, AP -7.3 ± 0.5 ; (Paxinos and Watson, 1995). The brain sections were collected serially in 24-well plates, so that the AP level of the sections could be easily identified according to their position in the plate.

Two consecutive sections for each rat were selected according to anatomical features (apparition of the subiculum) and sections were pre-incubated for 20 min at room temperature in phosphate buffer (PBS, 0.1 M, pH 7.4) containing 0.3% hydrogen peroxide, followed by 30 min in PBS containing 0.25% triton X-100 and 0.2% gelatin. They were incubated overnight at room temperature with rabbit-anti-c-Fos primary antibody (1:10000, Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) in PBS-triton-0.2% gelatin. This was followed by a 2 hr incubation in donkey-anti-rabbit secondary antibody (1:500, Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PN, USA) and then for 1 hr in the avidin-biotin complex (ABC Elite kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). After each incubation step, rinses were carried out in PBS containing 0.25% triton. A peroxidase-substrate-kit Vector SG (Vector laboratories) was used to develop the reaction product during a standardized period of 5 minutes. Sections were then mounted onto slides, dehydrated and coverslipped with permount. Quantitative examination of c-Fos immunoreactivity allowed a comparison of the different layers of the contralateral hemisphere with the stimulated eye in VS/HDB and HDB animals.

Double and triple immunostaining In order to determine the cell-specificity of the c-Fos immunoreactive cortical cells, we performed a double immunocytochemical study to examine whether c-Fos was expressed within (1) GABA cells labeled for parvalbumin (PV) and calretinin (CR), markers that covers the labeling of most GABA interneurons of the rat cortex (Gonchar and Burkhalter, 2003), (2) glutamatergic neurons using rat brain pyramidal cell marker (RBPC), a marker of the pyramidal cells. The antibodies were used at the following dilution: parvalbumin (1:10000, made in mouse, Sigma, Saint-Louis, MS, USA), Calretinin (1:5000, made in mouse, Chemicon, Temecula, CA, USA), RBPC (rat brain pyramidal cell antigen; 1:1000, made in mouse, Swant, Bellizona, Switzerland). Vibratome sections from the visual cortex were processed with the same protocol as that used for c-

Fos immunostaining. Sections were first incubated in the anti-c-Fos antibody and developed with Vector SG then consecutively incubated overnight in the other primary antibody and developed with DAB (Vector laboratories). The proportion of subpopulations of GABA or glutamatergic cells expressing c-Fos was evaluated in the stimulated hemisphere according to the layer (layer II/III, layer IV and layer V/VI) in the monocular (V1M) part of V1. The proportion of the double-labeled cells compared to total c-Fos cells was also evaluated. Total number of cells counted over 7 animals in the VS/HDB and HDB stimulated group is shown in parentheses PV-CR (339), RBPC (2526), c-Fos (6607). Balance between excitation and inhibition system (E/I ratio; number of c-Fos-RBPC neurons/ number of c-Fos-PV-CR neurons) was calculated, as E/I balance is changed during cortical plasticity at least during development.

Statistical analysis

Pre-training and post-training values of visual acuity were compared within each group using a paired Student's t-test. Between-group comparisons were performed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc LSD test for visual acuity and VEPs. For immunostaining data analysis, layer-specific comparisons were carried out using Mann-Whitney U test, since the number of cells were analyzed over 7 animals. All statistical analyses were carried out with SPSS 17.0 for Windows XP (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS

Pairing visual training with HDB activation in awake rats increases visual discrimination performance in a water maze task

To evaluate the effect of pairing visual training with BF activation, visual acuity (the spatial frequency threshold value for discriminating a sine-wave grating from a gray screen) was measured using the visual water maze task before and after the training period (Fig. 1, 2).

The procedures of the visual water task were learned prior to visual training, such that the post-training visual discrimination task tested changes in visual discrimination rather than procedural learning. We hypothesized the rat's visual acuity for the selected stimulus (30°) could be enhanced by training. Previous reports indicate the orientation that elicits the maximal cortical response in rodents was 0° (Girman et al., 1999). The 30° was selected because it is not optimal in naïve animals. The lower pre-training visual acuity for a 30° orientation sine-wave grating (0.70 ± 0.01 CPD) than for a 0° orientation sine-wave grating (0.87 ± 0.02 CPD, paired Student's t-test, $p < 0.001$) (Fig. 2B) and ceiling effect of visual performance at 0° orientation was demonstrated (pre training 0.86 ± 0.03 CPD, post training 0.85 ± 0.03 CPD; $p = 0.87$, VS/HDB/0) (Fig. 2B). These results are consistent with a recent study showing no expansion of cortical plasticity in well trained task (Reed et al., 2011).

Pairing daily visual training 30° orientation sine-wave grating with HDB stimulation induced a significant increase in visual acuity for the 30° sine-wave grating (VS/HDB group, 0.89 ± 0.01 CPD; VS/HDB/Sco group, 0.89 ± 0.01 CPD) compared with pre-training values (0.71 ± 0.02 , paired t-test, $p < 0.001$, Table 1, Fig. 2B). Post-training visual acuity for the 30° pattern in VS/HDB animals (0.89 ± 0.01 CPD) reached the value of visual acuity for a 0° sine-wave grating in naïve animals (0.87 ± 0.02 CPD, t-test, $p = 0.316$, Fig. 2B), suggesting that V1 neuronal responses to the 30° orientation improved to an extent that they were equivalent to V1 responses to the most efficient stimulus 0° . Visual acuity was not affected by sham treatment, by VS or HDB training alone (Fig. 2C, D, Table 1). Intergroup comparisons showed that post-training visual acuity was greater in the VS/HDB and VS/HDB/Sco groups compared with any other group (one-way ANOVA, $F[7,51] = 23.986$, $p < 0.001$ both).

Pairing visual training with HDB activation in awake rats is specific for cholinergic projections from HDB to V1

Lesion of the cholinergic fibers by injecting 192-IgG saporin in the HDB (VS/HDB/Sap) (Dotigny et al., 2008) or in the V1 (VS/HDB/SapV1) prior to VS/HDB training significantly attenuated the enhancement of visual discrimination (paired pre-post training t-test, $p=0.215$, $p=0.771$, respectively) (Fig. 2C, D and table 1). The use of mAChR antagonist scopolamine during the post-training testing period (VS/HDB/Sco group) did not impair animal performance, as post-training acuity for animals that received scopolamine was not significantly different to animals that did not (ANOVA, post-hoc LSD, $p=0.929$). Post-training acuity for both of these groups was significantly improved compared with results from acuity pre-training (paired t-test, $p<0.001$, and $p=0.009$), indicating that improved visual acuity resulted from changes acquired during the training period, rather than a result of enhanced cholinergic transmission during the test. This finding suggests that HDB cholinergic neurons projecting to V1 contribute to this effect. This result is consistent with the study in the auditory cortex, showing that pairing nucleus basalis stimulation with auditory stimulation can induce cortical map plasticity (Kilgard and Merzenich, 1998; Froemke et al., 2007).

Improvement of visual discrimination performance for a 30° grating by pairing visual training with HDB activation in awake rats do not occur at the expense of – or transfer to other orientations

Additional post-training visual acuity testing using a 0° orientation pattern in the VS/HDB rats showed that the performance for the 0° orientation was not altered (0.873 ± 0.02 CPD vs 0.87 ± 0.02 CPD, paired t-test, $p=0.9$, Fig. 2B). This suggests the improvement in visual discrimination for a 30° orientation pattern did not occur at the expense of selectivity for the 0° orientation. This implies that orientation preference of neurons was not changed and that improving responses for a feature (30°) does not necessarily result in diminished processing of an untrained stimulus. This is consistent with a recent proposal suggesting

that sensory discrimination learning occurs through cortical processing using the most efficient neuronal circuitry rather than a permanent wiring changes (Bentley et al., 2011).

The lack of improvement of the visual performance using 0° orientation in the VS/HDB rats also suggest that visual discrimination performance improvement elicited by the VS/HDB training do not transfer to other orientations (Fig. 2B, see above). Additional testing was performed in VS/HDB/150 group, where the orientation of the stimulus used for visual discrimination testing (150°) in both pre- or post-training testing was different from the (30°) used for visual training. Post-training visual performance of these VS/HDB/150 animals was not improved compared to pre-training values (0.69 ± 0.02 vs 0.71 ± 0.03 CPD, $p=0.289$, Fig. 2B). Thus, improvement in visual discrimination was orientation selective. This is consistent with previous study showing that increased cortical response for a specific orientation has not been proved transferable to another orientation (Cooke and Bear, 2010).

Pairing visual training with HDB activation in awake rats increases the amplitude of visual evoked potentials in V1

To determine whether the change in visual acuity correlated with a modification in cortical processing, visual evoked potentials were recorded in V1 after the training period. The signal-to-baseline ratio of averaged cortical responses to the presentation of a sine-wave grating (30°, 0.12 CPD) was significantly greater in the VS/HDB group compared with the CTL group (one-way ANOVA, $F[4,22]=3.977$, $p=0.02$), the VS group ($p=0.04$) or the HDB group ($p=0.048$), but was not significantly different when compared with the VS/HDB/Sco group ($p=0.368$) (Fig. 4A). A similar result was previously shown with VEP and single unit recording revealed that such modulation was not due to change of neurons' preferred orientation but rather a shift in the orientation index, which is a relative measure between preferred and orthogonal orientation (Frenkel et al., 2006).

Pairing visual training with HDB activation in awake rats dramatically increases c-Fos immunoreactivity in V1

The number of c-Fos immunoreactive neurons was significantly increased in all cortical layers in the cholinergic stimulated hemisphere of VS/HDB animals (Table 2) compared with the contralateral hemisphere, which did not show c-Fos immunoreactivity. As previously shown (Dotigny et al., 2008), VS animals exhibited c-Fos labeling in layer IV (thalamus recipient) of the stimulated hemisphere but not in the other cortical layers or the contralateral hemisphere (data not shown). Consistently, c-Fos labeling in the layer IV was stronger in VS/HDB animals compared to HDB animals (Mann-Whitney, $p=0.016$), suggesting that HDB stimulation evoked strong labeling in layer II/III and V, but not IV. Interestingly, as the c-Fos immunoreactivity experiment was performed one week after the last stimulation session (allowing time for behavioral and electrophysiological testing), these results demonstrate that neuronal reactivity in V1 following these training conditions is long-lasting. It has to be noted that only half (4) of animals of the HDB group expressed c-Fos labeling in V1, showing variable labeling in this group. This suggests HDB stimulation enhanced visually-induced c-Fos expression one week after the last HDB stimulation only when the stimulus was paired with sensory stimulus (most probably natural light in the HDB group).

Pairing visual training with HDB activation in awake rats activates both GABAergic and glutamatergic neurons in V1

A subpopulation of both pyramidal and GABAergic cells were immunoreactive for c-Fos, i.e. activated, in V1 of VS/HDB animals. The percentage of GABAergic cells that were activated was elevated in all investigated cortical layers of V1 (41-53%), suggesting the involvement of inhibitory cortical microcircuits (Table 2). The percentage of pyramidal cells that were activated was lower (11-25%), but given the larger number of pyramidal cells in the cortex, this observation suggests a clear effect of VS/HDB training on pyramidal neuron activation (Table 2). There were significantly more PV-CR as well as

RBPC neurons immunoreactive for c-Fos in layer IV of VS/HDB animals compared to HDB (Mann-Whitney, $p=0.027$ and 0.002 , respectively). In addition, there were significantly more RBPC neurons immunoreactive for c-Fos in layer II/III ($p=0.049$) and more PV-CR neurons immunoreactive for c-Fos in layer V/VI ($p=0.038$) of VS/HDB animals compared to HDB. This suggests an effect of VS/HDB training on pyramidal neuron activation, consistently with the flow of cortical activation from the thalamo-cortical recipient layer to superficial cortical layers.

The E/I ratio (average of the ratio of number of c-Fos-RBPC neurons / number of c-Fos-PV-CR neurons, calculated for each animal) was significantly lower in the layers V/VI of VS/HDB stimulated animals (1.92 ± 0.38) compared to HDB stimulated animals (7.72 ± 0.68 , Mann-Whitney, $p=0.034$). It was not significantly different in layer II/III or IV in VS/HDB compared to HDB group (Mann-Whitney, $p=0.248$, $p=1.000$, respectively) although there was a non significant increase of E/I ratio in the layers II/III in VS/HDB animals for these particular layers.

DISCUSSION

The present study demonstrates that repeated pairing of visual system activation with BF stimulation in awake rats - a possible training paradigm for visual rehabilitation - improves the visual capacity of rats and results in a long-term increase in neuronal activity in V1 in both glutamatergic and GABAergic neurons. These results support a role for the cholinergic system in perceptual learning by modulating V1 neuronal activity and the balance of excitatory/inhibitory cortical microcircuits.

VS/HDB activation induces long-term changes in V1 related to perceptual learning

This study shows orientation specific perceptual learning only when VS was coupled with HDB stimulation. Improved visual acuity for the 30° orientation was long-lasting, orientation selective, and preserved the initial visual acuity for the untrained stimulus (0° orientation). It was associated with stronger long-term V1 reactivity, as shown by increased

VEP amplitude and c-Fos expression. These features could be attributed to perceptual learning, i.e., a long-term change in perceptual capacity (Recanzone et al., 1993; Reed et al., 2011) and neuronal wiring (Fahle, 2004) or a change in a task relevant to learning (Sasaki et al., 2010). Our results are in agreement with several studies showing that changes in orientation (Schoups et al., 2001; Frenkel et al., 2006) or contrast (Hua et al., 2010) sensitivity might be induced by perceptual learning. Our results further demonstrate that visual acuity does not change for an untrained orientation (0° or 150°) stimulus. This is in agreement with previous studies of perceptual learning showing discrete and selective, but not global, changes in stimulus processing (Crist et al., 1997; Li et al., 2004). This observation suggests that improvement was not due to widespread visual cortex activation. Instead, the improvement in discrimination ability may be attributed to an increase in the number or efficacy of neurons selective for the 30° orientation, which represent a lower proportion of neurons than those selective for orientations of 0° under naive conditions (Girman et al., 1999). Improved discrimination for 30° patterns was shown for the VS/HDB group but not the VS group, which suggests that VS training by itself is not sufficient to elicit perceptual learning, at least in our experimental conditions. Additionally, passive exposure to other kinds of sensory stimuli does not result in cortical map plasticity (Bao et al., 2001). It is possible that our training method facilitates the modification to expand to untrained spatial frequency (0.8 CPD or over) but within same orientation (Frenkel et al., 2006). Furthermore, HDB stimulation in the absence of VS stimulation did not result in enhanced visual acuity. Taken together, these findings strongly support the gain of coupling HDB stimulation and visual input to improve perception.

Based on our results and previous studies (Dringenberg et al., 2006; Kang and Vaucher, 2009), it is likely that perceptual learning occurred by reinforcement of the cortical microcircuitry by HDB projections to V1 through mechanisms related to attention and/or NMDAR dependent-LTP. Although it has been demonstrated that acute stimulation of the BF induced c-Fos expression in the cortex (Dotigny et al., 2008), we show for the first time that c-Fos reactivity could persist for at least 5 days after the last HDB stimulation. This

suggests the coupling of HDB and sensory stimulation enhances the reactivity of neurons to subsequent visual stimulation. At a cellular level, this long-term effect could be related to cortical LTP, i.e., an increase in synaptic strength elicited by heterosynaptic stimulation from both HDB and glutamatergic fibers. According to previous work, c-Fos expression is actually an index of LTP (Kaczmarek and Chaudhuri, 1997; Dotigny et al., 2008). In addition, the theta-burst stimulation of layer I of V1 has been associated to an increase of ACh release and modulation of post-synaptic potentials in layer V neurons (Amar et al., 2010). It is therefore likely that repeated VS/HDB stimulation elicits a change in synaptic strength, similar to what occurs during perceptual learning.

Visual processing is modulated by cholinergic activity

Although the effects of electrical HDB stimulation could not be attributed solely to the activation of cholinergic neurons, there is considerable evidence suggesting the plasticity observed in this study mainly results from cholinergic transmission. First, the HDB electrical stimulation paradigm has been designed to mimic the electrical properties of BF cholinergic cells rather than GABAergic neurons (see Kang and Vaucher, 2009). Second, improvements in visual acuity and cortical reactivity are completely abolished by specific lesion of the cholinergic cells of the BF or cholinergic fibers in V1. This is in agreement with previous studies showing that regulation of blood flow induced by this type of BF stimulation are mediated through muscarinic, but not GABAergic mechanisms (Kocharyan et al., 2007). Moreover, previous studies have demonstrated that cholinergic transmission impairment abolished visually-induced c-Fos expression in V1 and that cholinergic specific enhancement in cortical responsiveness results from either immediate or long-term mechanisms (Kang and Vaucher, 2009). Our results are comparable with those observed in studies of the functioning of the cholinergic system in attention (Sarter et al., 2005; Herrero et al., 2008), learning (Dotigny et al., 2008) and modulation of the electrophysiological properties of V1 neurons (Zinke et al., 2006; Goard and Dan, 2009; Kang and Vaucher, 2009). Learning processes are blocked by cholinergic lesions or by antagonizing the cholinergic system pharmacologically (Conner et al., 2003). Therefore, in agreement with

what has been suggested by computational modeling (Vidnyanszky and Sohn, 2005; Roelfsema et al., 2010), we propose that ACh induces perceptual learning primarily by inducing attentional processes and LTP-like mechanisms.

Reorganization induced by cholinergic system activation is mediated by change of excitatory-inhibitory balance

In the present study, double-immunocytochemistry revealed that in addition to layer IV, most cortical layers were activated in V1 of VS/HDB animals. This activation involved both excitatory and inhibitory neurons. E/I ratio was lower in layer V/VI in VS/HDB compared to HDB conditions, reflecting a stronger proportion of activated GABAergic neurons in this layer. GABAergic cell activation is particularly interesting because recent studies have shown that inhibitory neurons are essential for ocular dominance plasticity (Beston et al., 2010; Harauzov et al., 2010; Sale et al., 2010), although it is still not clear whether cortical plasticity is induced by their activation or their inhibition. This shift in the inhibitory drive of layer V influenced by the cholinergic system is consistent with previous studies (Lucas-Meunier et al., 2009). Although this did not reach significance, there was a tendency to a higher E/I ratio in the layer II/III corresponding to an increased proportion of c-Fos activated RBPC cells in VS/HDB. It is consistent with a resetting of the E/I balance in the layer II/III which would favor cortical plasticity, as suggested by Hensch and colleagues (Bavelier et al., 2010; Morishita et al., 2010). The E/I ratio was identical in layer IV for both groups. These results suggest that pairing cholinergic fibers and visual stimulation shifts the E/I balance with layer specificity. As E/I balance change has been suggested to participate to cortical plasticity (Gandhi et al., 2008; Yazaki-Sugiyama et al., 2009; Morishita et al., 2010), the present change might contribute to facilitate cortical reorganization and fine-tune visual processing to a 30° sine-wave grating.

The c-Fos induced by VS stimulation is commonly expressed in layer IV (Dotigny et al., 2008). However, daily pairing of ACh release and thalamocortical activation resulted in an enhanced increase in c-Fos reactivity in cortico-cortical layer II/III and layer V upon visual

stimulation (during VEP recording), suggesting that our VS/HDB training induced long-term ascending cortical activation to upper cortical areas (Callaway, 2004). This response could arise from nAChR activation of thalamocortical fibers in layer IV (Gil et al., 1997); from M1 mAChR excitation of glutamatergic neurons in layer II/III and layer IV by facilitating postsynaptic NMDAR opening (Calabresi et al., 1998; Gu, 2003); from disinhibition of intracortical network through M2 mAChR or nAChR receptors located on GABAergic cells (Salgado et al., 2007) or perisomatic GABAergic terminals (Kruglikov and Rudy, 2008); from disinhibition of feedback cortical control by mAChR located on corticocortical fibers (Gil et al., 1997). The overall effect of VS/cholinergic stimulation is a vertical spread of thalamocortical activation, where a bottom-up excitation of layer IV is transmitted from layer II/III neurons and then to higher visual areas (Callaway, 2004). As this c-Fos expression is evoked by visual stimulation one week after VS/HDB last stimulation, this suggests a persistent change in the microcircuitry neurotransmission efficacy. However, it is unclear whether lateral spreading is enhanced. According to previous studies, high extracellular levels of ACh reduce the lateral spreading of the thalamocortical activation, allowing finer control of the processing of a specific stimulus (Kimura et al., 1999; Silver et al., 2008). The improved selectivity for the 30°, but not the 0° or 150° orientation, as well as the excitation of PV cells (most probably intralaminar basket cells) is consistent with a lack of excitation in neighboring cells with different preferred orientation selectivity. In conclusion, the neuronal activation found in this study, which increases visual discrimination on a long-term scale, may originate from continuous facilitation of thalamocortical activation. This may in turn, lead to the postsynaptic modification (e.g., LTP, synaptogenesis or increased density of varicosities) of recipient neurons (i.e., spiny stellate or pyramidal cells) and an increase in responsiveness.

CONCLUSION

This study demonstrated that visual training associated with cholinergic transmission builds strong ‘memory traces’ that result in cortical plasticity in the visual cortex and increased

perception. These mechanisms might be related to attention and induce transient but long-lasting, changes in neuronal reactivity. This correlates the latest theory of sensory learning, which suggests that cortical map expansion and renormalization may occur. Stimulation of BF afferents during visual training may induce an imbalance in excitatory-inhibitory systems by temporally tuning firing and subsequently releasing from a cortical plasticity 'brake' in V1 in the adult. The demonstration of the long-lasting enhancement of perceptual learning and cortical efficiency following repeated, coupled cholinergic and visual activation in awake rats provides hope that it may be possible to develop efficient rehabilitation strategies to improve plasticity in cortical areas with impaired sensory input and thus facilitate visual recovery.

REFERENCES

- Amar M, Lucas-Meunier E, Baux G, Fossier P (2010) Blockade of different muscarinic receptor subtypes changes the equilibrium between excitation and inhibition in rat visual cortex. *Neuroscience* 169:1610-1620.
- Bao S, Chan VT, Merzenich MM (2001) Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature* 412:79-83.
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK (2010) Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci* 30:14964-14971.
- Bear MF, Singer W (1986) Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* 320:172-176.
- Bentley P, Driver J, Dolan RJ (2011) Cholinergic modulation of cognition: Insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Prog Neurobiol* 94:360-388.
- Beston BR, Jones DG, Murphy KM (2010) Experience-dependent changes in excitatory and inhibitory receptor subunit expression in visual cortex. *Front Synaptic Neurosci* 2:138.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (1998) Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10:2887-2895.

Callaway E (2004) Feedforward, feedback and inhibitory connections in primate visual cortex. *Neural Networks* 17:625-632.

Conner JM, Culberson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38:819-829.

Cooke SF, Bear MF (2010) Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *J Neurosci* 30:16304-16313.

Crist RE, Kapadia MK, Westheimer G, Gilbert CD (1997) Perceptual learning of spatial localization: specificity for orientation, position, and context. *J Neurophysiol* 78:2889-2894.

Dotigny F, Ben Amor AY, Burke M, Vaucher E (2008) Neuromodulatory role of acetylcholine in visually-induced cortical activation: behavioral and neuroanatomical correlates. *Neuroscience* 154:1607-1618.

Dringenberg HC, Hamze B, Wilson A, Speechley W, Kuo MC (2006) Heterosynaptic Facilitation of In Vivo Thalamocortical Long-Term Potentiation in the Adult Rat Visual Cortex by Acetylcholine. *Cereb Cortex* 17:839-848.

Fahle M (2004) Perceptual learning: a case for early selection. *J Vis* 4:879-890.

Frenkel MY, Sawtell NB, Diogo AC, Yoon B, Neve RL, Bear MF (2006) Instructive effect of visual experience in mouse visual cortex. *Neuron* 51:339-349.

Froemke RC, Merzenich MM, Schreiner CE (2007) A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 450:425-429.

- Gandhi SP, Yanagawa Y, Stryker MP (2008) Delayed plasticity of inhibitory neurons in developing visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:16797-16802.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 293:103-124.
- Gil Z, Connors BW, Amitai Y (1997) Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* 19:679-686.
- Girman SV, Sauve Y, Lund RD (1999) Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 82:301-311.
- Goard M, Dan Y (2009) Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nat Neurosci* 12:1444-1449.
- Gonchar Y, Burkhalter A (2003) Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci* 23:10904-10912.
- Greuel JM, Luhmann HJ, Singer W (1988) Pharmacological induction of use-dependent receptive field modifications in the visual cortex. *Science* 242:74-77.
- Gu Q (2003) Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory* 80:291-301.
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) Reducing Intracortical Inhibition in the Adult Visual Cortex Promotes Ocular Dominance Plasticity. *Journal of Neuroscience* 30:361-371.
- Herrero JL, Roberts MJ, Delicato LS, Gieselmann MA, Dayan P, Thiele A (2008) Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1. *Nature* 454:1110-1114.

Hua T, Bao P, Huang C-B, Wang Z, Xu J, Zhou Y, Lu Z-L (2010) Perceptual Learning Improves Contrast Sensitivity of V1 Neurons in Cats. *Current Biology* 20:887-894.

Kaczmarek L, Chaudhuri A (1997) Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 23:237-256.

Kang JI, Vaucher E (2009) Cholinergic pairing with visual activation results in long-term enhancement of visual evoked potentials. *PLoS One* 4:e5995.

Kilgard MP, Merzenich MM (1998) Cortical Map Reorganization Enabled by Nucleus Basalis Activity. *Science* 279:1714-1718.

Kimura F, Fukuda M, Tsumoto T (1999) Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: possible differential effect depending on the source of input. *EurJNeurosci* 11:3597-3609.

Kocharyan A, Fernandes P, Tong X-K, Vaucher E, Hamel E (2007) Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *Journal of Cerebral Blood Flow ; Metabolism* 28:221-231.

Kruglikov I, Rudy B (2008) Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron* 58:911-924.

Kuczewski N (2005) Acetylcholine modulates cortical synaptic transmission via different muscarinic receptors, as studied with receptor knockout mice. *The Journal of physiology* 566:907-919.

Laplante F, Morin Y, Quirion R, Vaucher E (2005) Acetylcholine release is elicited in the visual cortex, but not in the prefrontal cortex, by patterned visual stimulation: A dual microdialysis study with functional correlates in the rat brain. *Neuroscience* 132:501-510.

Li W, Piëch V, Gilbert CD (2004) Perceptual learning and top-down influences in primary visual cortex. *Nat Neurosci* 7:651-657.

Lucas-Meunier E, Monier C, Amar M, Baux G, Fregnac Y, Fossier P (2009) Involvement of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. *Cereb Cortex* 19:2411-2427.

Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK (2010) *Lynx1*, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* 330:1238-1240.

Paxinos G, Watson CR (1995) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3rd Edition. Sydney: Academic Press.

Prusky GT, West PW, Douglas RM (2000) Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Res* 40:2201-2209.

Recanzone GH, Schreiner CE, Merzenich MM (1993) Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys. *J Neurosci* 13:87-103.

Reed A, Riley J, Carraway R, Carrasco A, Perez C, Jakkamsetti V, Kilgard MP (2011) Cortical map plasticity improves learning but is not necessary for improved performance. *Neuron* 70:121-131.

Roberts MJ, Zinke W, Guo K, Robertson R, McDonald JS, Thiele A (2004) Acetylcholine Dynamically Controls Spatial Integration in Marmoset Primary Visual Cortex. *J Neurophysiol* 93:2062-2072.

Roelfsema PR, van Ooyen A, Watanabe T (2010) Perceptual learning rules based on reinforcers and attention. *Trends Cogn Sci* 14:64-71.

Rokem A, Silver MA (2010) Cholinergic enhancement augments magnitude and specificity of visual perceptual learning in healthy humans. *Current biology* : CB 20:1723-1728.

Sabel BA, Henrich-Noack P, Fedorov A, Gall C (2011) Vision restoration after brain and retina damage: The “residual vision activation theory”. *Prog Brain res* 192:199-262.

Sale A, Berardi N, Spolidoro M, Baroncelli L, Maffei L (2010) GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Front Cell Neurosci* 4:10.

Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L, Atzori M (2007) Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel modulation through activation of PI3K/Ca²⁺ -independent and PLC/Ca²⁺ -dependent PKC. *J Neurophysiol* 98:952-965.

Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Research Reviews* 48:98-111.

Sasaki Y, Nanez JE, Watanabe T (2010) Advances in visual perceptual learning and plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11:53-60.

Schoups A, Vogels R, Qian N, Orban G (2001) Practising orientation identification improves orientation coding in V1 neurons. *Nature* 412:549-553.

Silver MA, Shenhav A, D'Esposito M (2008) Cholinergic Enhancement Reduces Spatial Spread of Visual Responses in Human Early Visual Cortex. *Neuron* 60:904-914.

Vaucher E, Borredon J, Bonvento G, Seylaz J, Lacombe P (1997) Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the conscious rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17:686-694.

Vidnyanszky Z, Sohn W (2005) Learning to suppress task-irrelevant visual stimuli with attention. *Vision Research* 45:677-685.

Yazaki-Sugiyama Y, Kang S, Cateau H, Fukai T, Hensch TK (2009) Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. *Nature* 462:218-221.

Zinke W, Roberts MJ, Guo K, McDonald JS, Robertson R, Thiele A (2006) Cholinergic modulation of response properties and orientation tuning of neurons in primary visual cortex of anaesthetized Marmoset monkeys. *European Journal of Neuroscience* 24:314-328.

Table 1. Pre and post-training visual acuity for the 30° orientation sine-wave grating

	CTL	VS	HDB	VS/HDB	VS/HDB/Sco	VS/HDB/Sap
Pre	0.75 ±0.03	0.73 ±0.03	0.69 ±0.05	0.71 ±0.05	0.70 ±0.07	0.60 ±0.00
Post	0.76 ±0.02	0.76 ±0.04	0.63 ±0.06	0.89 ±0.01*	0.89 ±0.01*	0.70 ±0.00

Values are CPD (cycle per degree) expressed as mean ± standard deviation

*, paired Student t-test, p<0.05

Table 2. Number and nature of activated neurons in monocular area of the activated visual cortex.

Cortical area	c-Fos	c-Fos-RBPC	c-Fos-PV-CR
	[6607]	[309]	[126]
V1M HDB			
<i>Layers II/III</i>	129.0 ± 21.0	5.0 ± 2.8 (3.8%)	2.2 ± 1.2 (31.2%)
<i>Layer IV</i>	100.0 ± 10.2	3.3 ± 1.5 (2.6%)	1.7 ± 0.7 (8.5%)
<i>Layers V/VI</i>	110.0 ± 15.4	14.7 ± 2.8 (8.5%)	2.0 ± 0.3 (22.1%)
V1M VS/HDB			
<i>Layers II/III</i>	194.8 ± 29.3	40.1 ± 16.9 ^a (25.1%)	4.4 ± 1.5 (41.3%)
<i>Layer IV</i>	201.2 ± 27.7 ^a	19.9 ± 8.6 ^a (12.3%)	8.7 ± 2.0 ^a (53.1%)
<i>Layers V/VI</i>	127.1 ± 22.9	13.7 ± 4.1 (10.5%)	5.7 ± 1.4 ^a (41.1%)

Values are number of cells/mm² expressed as mean ± s.e.m. Numbers in accolades are total number of cell counted. Numbers in parentheses are the percentage of activated neurons (c-Fos-RBPC/RBPC or c-Fos-PV-CR/PV-CR ratio x 100).

a, p<0.05, compared to V1M HDB counterparts, Mann-Withney

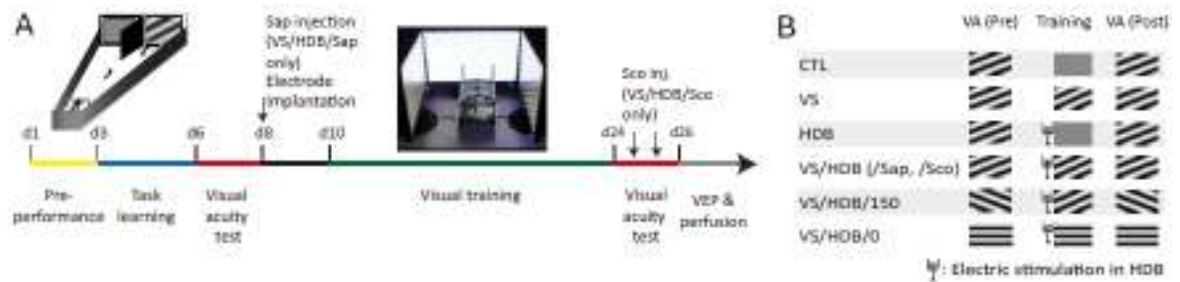


Figure 1. Timeline of the experimental procedure and stimulus parameter for different groups. A) The visual acuity was measured using a visual water maze (upper left schematic) before and after 14 days of visual/sham training in the presence or absence of pairing with HDB stimulation. The pre-training value of visual acuity was taken after 6 days of procedural learning. Visual/sham training was provided 10 min/day for 14 days to awake rats restrained in front of 3 screens (photograph). B) Six paradigms were administered, depending on the experimental group: CTL, sham training/no HDB stimulation; VS, visual training (sinusoidal grating presentation training)/no HDB stimulation; HDB, sham training/HDB stimulation; VS/HDB, visual training/HDB stimulation. VS/HDB regimen was also administered in VS/HDB/Sap and VS/HDB/Sco. Electrode implantation and 192IgG-saporin injections occurred at day 8, and scopolamine was injected in the VS/HDB/Sco group 30 min before the post-training acuity test. Post-training visual acuity was measured after training (d24), then VEPs were recorded and the brains were fixed for immunocytochemistry.

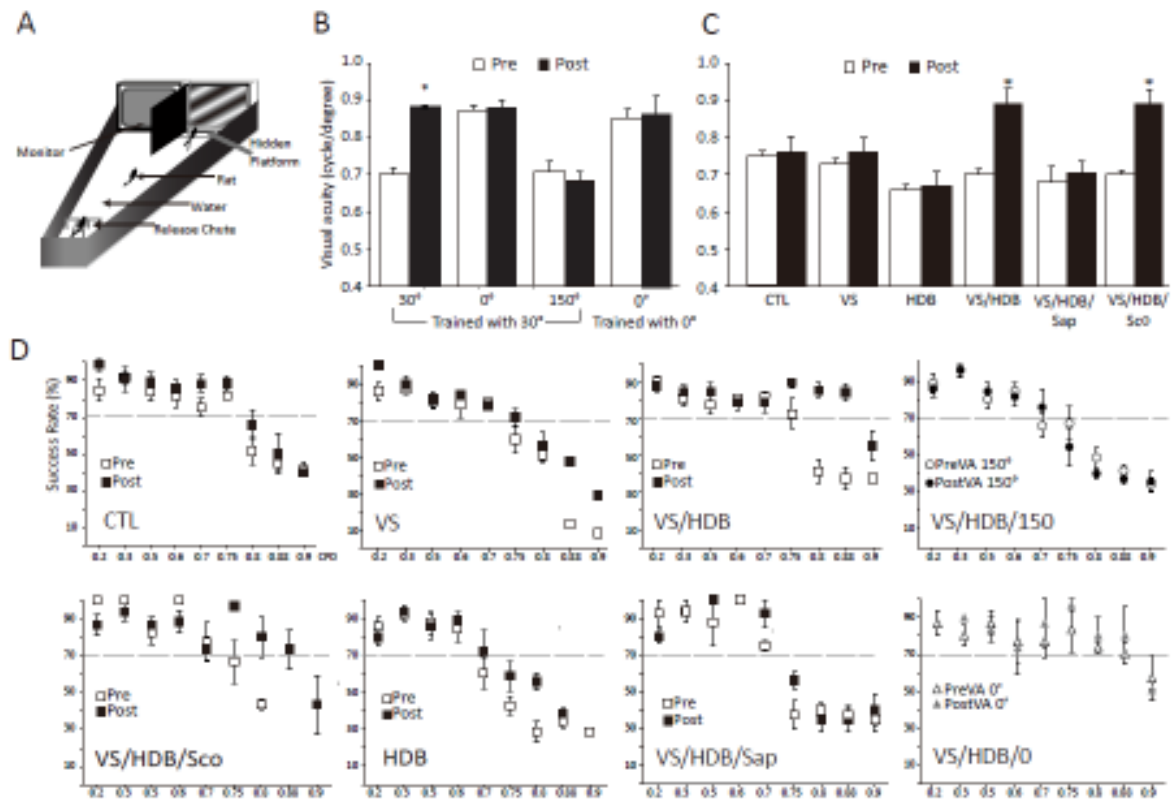


Figure 2. Change of visual acuity in each experimental paradigm. A) Schematic representation of the visual water maze, (adapted from Prusky et al., 2000). B) 30°, 0°, 150° visual acuity measured after training with 30° stimulus (left) and 0° visual acuity measured after training with 0° stimulus (right). The pre-training visual acuity for a 30° sine-wave grating was lower than acuity for a 0° stimulus, but both values were identical after training in the VS/HDB group. Visual acuity for 150° (training with 30° stimulus) or visual acuity for 0° (training with 0° stimulus) was not changed after training. C) Pre- and post-training values of the visual discrimination threshold for each group. Note that only the VS/HDB and VS/HDB/Sco groups showed better discrimination ability after visual training. D) Success rates for each group in response to each spatial frequency presented. Note that in the CTL, VS, HDB, VS/HDB/Sap, VS/HDB/SapV1 and VS/HDB/150

groups, the success rate after 0.75 CPD was not statistically different for pre- (open square) and post-training experiments (filled square). By contrast, in the VS/HDB and VS/HDB/Sco groups, the success rate significantly increased (see text for details) after training. (*, pre-post paired t-test, $p < 0.05$). Error bars represent \pm s.e.m.

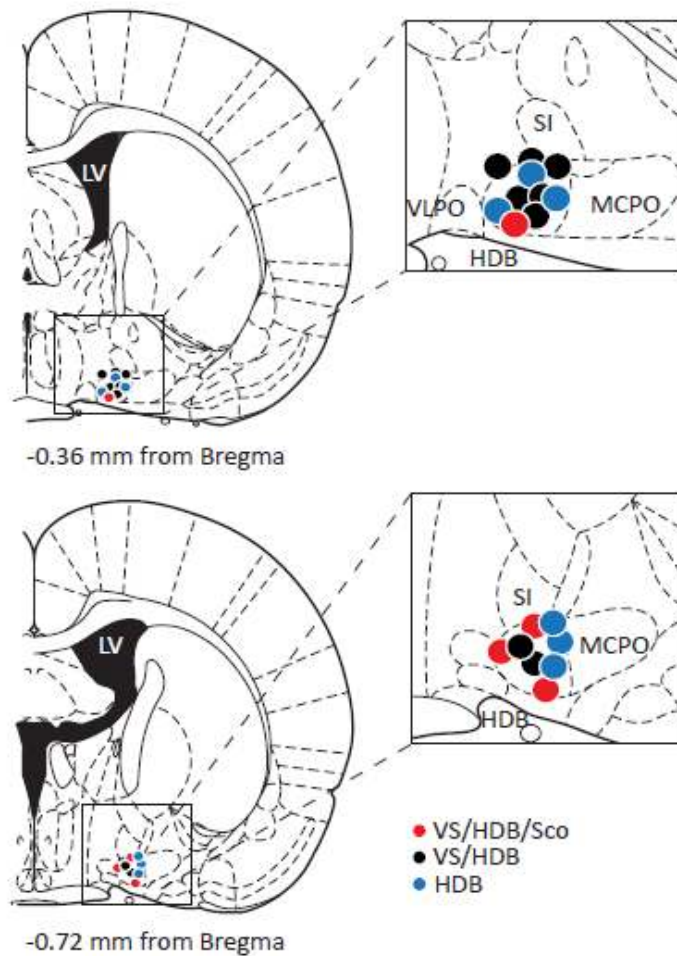


Figure 3. Localization of the electrode implantation sites on coronal sections at the level of the HDB. Implanted electrode sites were localized following electrolytic lesion and examination on cresyl violet stained sections. The sites are drawn on the corresponding diagram from the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1995). HDB, horizontal diagonal band of Broca; LV, lateral ventricle; MCPO, magnocellular preoptic nucleus; SI, substantia innominate; VLPO, ventrolateral preoptic nucleus.

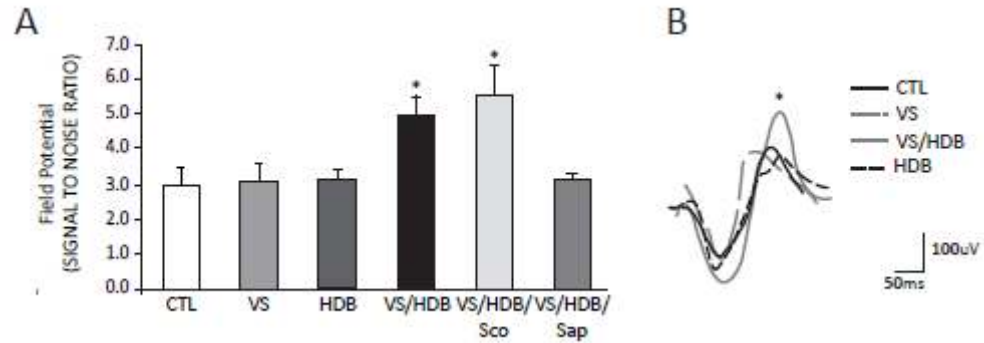


Figure 4. Cortical response of V1 in CTL, VS, HDB, VS/HDB and VS/HDB/SCO conditions. A) VEP recording data. In the VS/HDB group, the amplitude of the VEP recorded during presentation of the 30° sine-wave grating was higher than any other groups except VS/HDB/SCO. B) Representative traces of VEP recordings of CTL, VS, HDB, and VS/HDB groups. (*, ANOVA, $p < 0.05$, error bars represent \pm SEM)

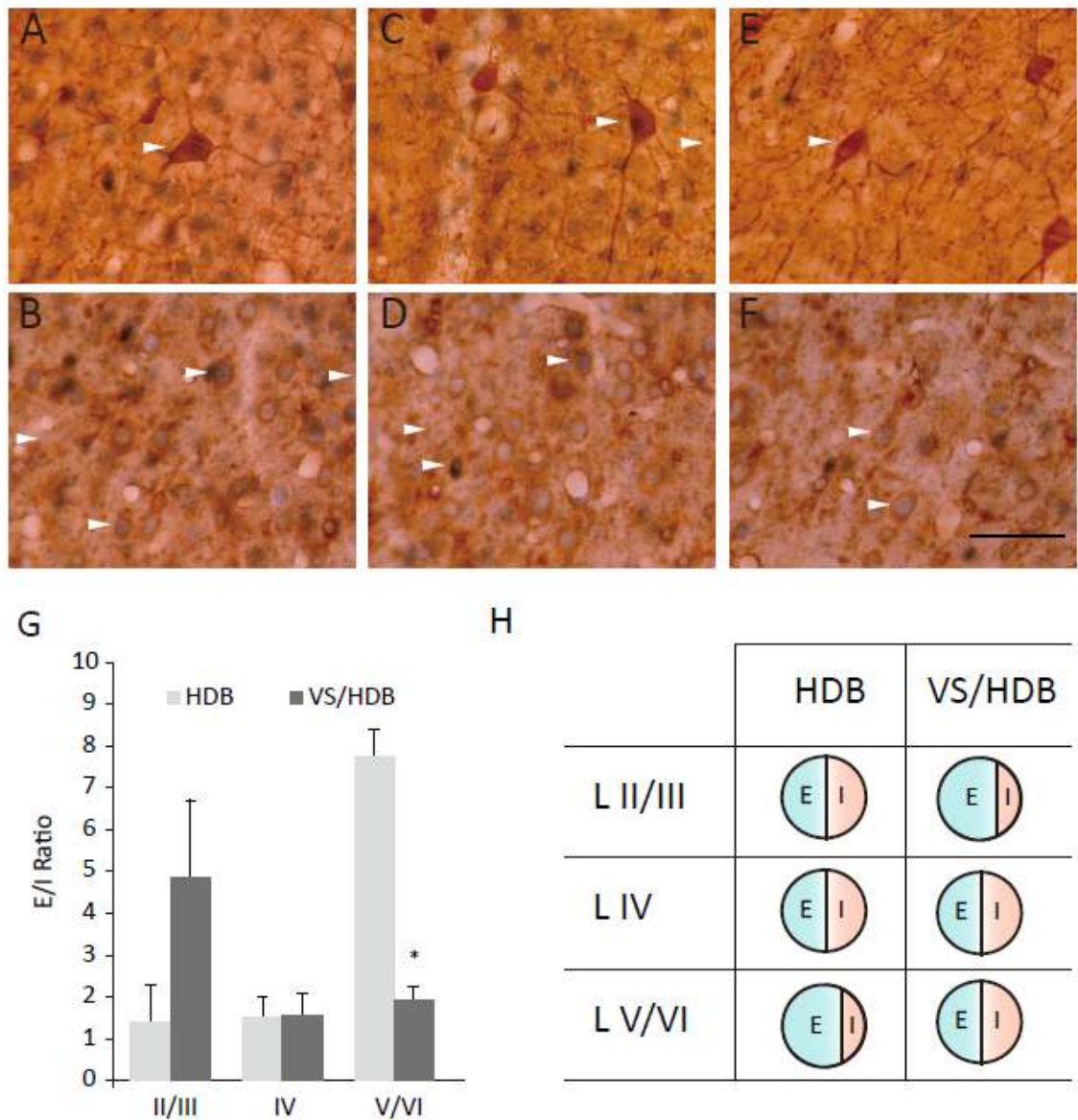


Figure 5. Neurochemical phenotype of activated c-Fos neurons in V1. A-F) Microphotographs (40x) of coronal brain sections, double-immunostained (arrow heads) for c-Fos (Vector SG, bluish-gray) and either GABAergic (DAB, brown, upper panel) or pyramidal (DAB, brown, lower panel) neurons (mm from Bregma, AP -7.3). A-C) c-Fos-PV-CR neurons in layers II/III (A), IV(B), or V/VI (C) of V1, and D-F) c-Fos-RBPC (rat brain pyramidal cell antigen) neurons in layers II/III (D),

IV (E), or V/VI (F). The histograms in G) show the change in the excitation/inhibition (E/I) ratio – number of c-Fos- RBPC cells / number of c-Fos-PV-CR cells in VS/HDB stimulation compared to HDB stimulation (taken as a control). Note the E/I ratio was significantly higher in layer V/VI of VS/HDB rats compared to HDB rats, reflecting a greater proportion of GABAergic-cFos activated neurons. H) Representation of E/I ratio (number of c-Fos-RBPC neurons/ number of c-Fos-PV-CR neurons) in each layer of V1. There were increase of excitatory neurons in layer II/III and inhibitory neurons in layer V/VI of VS/HDB animals. Scale bar 50 μ m.

III. Discussion

III.1. Rappel des hypothèses et des résultats obtenus

Les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire démontrent clairement que l'acétylcholine a une influence importante sur la plasticité fonctionnelle du cortex visuel primaire, que celle-ci se produise naturellement lors du développement ou qu'elle soit induite chez l'animal adulte.

L'intérêt d'étudier la vision chez le modèle murin permet d'explorer, entre autre, les fonctions cérébrales, car il offre la possibilité d'utiliser des lignées knock-out et transgéniques ce qui nous a permis ici d'aller cibler la composante cholinergique. Les modèles murins chez qui les récepteurs M1, M1/M3, M2/M4 ont été délétés ainsi que leurs témoins ont été utilisés afin de déterminer le rôle de ces récepteurs cholinergiques dans l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire. Ces souris particulières ont été choisies car des études sur des tranches corticales de V1 de celles-ci présentaient des propriétés très intéressantes. En effet, un rôle des mAChRs dans la plasticité à long terme (LTP ou LTD) lors de stimulations électriques a été démontré. Tout comme dans le cas présent, des souris KO pour différents récepteurs muscariniques ont été utilisées et chez les souris M2/M4 double KO, l'application d'une stimulation à haute fréquence, qui induit normalement une LTP, l'abolit tandis que l'effet est conservé chez les M1/M3 double KO. À l'application sur ces mêmes tranches corticales visuelles d'une stimulation à faible fréquence qui produit normalement l'effet inverse, les animaux M1/M3 présentent une LTP, tandis que les souris M2/M4 produisent la LTD normale (Origlia et al., 2006). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que ces récepteurs étaient nécessaires à la formation d'une organisation visuelle normale. En effet, ces formes de plasticité synaptique sont en grande partie régulées par le système cholinergique et sont impliquées dans la formation des connectivités neuronales de même que la mémoire et l'apprentissage (Brocher et al., 1992). Une réduction de l'innervation corticale cholinergique a comme conséquence de produire une LTD plutôt qu'une LTP (Kuczewski et al., 2005b). En fait, nous avons dû faire une distinction car selon nos résultats, les récepteurs muscariniques ne semblent pas être

impliqués dans l'organisation structurelle de V1 mais seraient plutôt modulateurs de l'organisation fonctionnelle (Sillito and Kemp, 1983). En effet, aucune différence entre les divers groupes ne ressort en ce qui a trait à la surface ou à la forme de V1. Toutefois, les souris M1/M3-KO présentent une diminution de leur fréquence spatiale optimale, de leur sensibilité au contraste et de la taille des champs récepteurs. Les souris M1-KO présentent quant à elles une diminution de la sensibilité aux contrastes, du champ visuel apparent, de la taille des champs récepteurs. Finalement, chez les souris M2/M4-KO, on observe une augmentation du champ visuel apparent et de leur index de scatter.

Le système cholinergique est donc connu comme étant impliqué dans la formation d'une potentialisation à long terme. Tel que notre hypothèse le prévoyait, il a été observé qu'un entraînement visuel combiné à un entraînement cholinergique (ici électrique) est en mesure de produire des modifications au niveau de l'activité neuronale. Effectivement, une augmentation du marquage c-Fos est accrue chez ces animaux. Qui plus est, l'équilibre exciteur/inhibiteur, qui définit le potentiel de plasticité, est aussi modifié. En effet, l'entraînement cholinergique couplé à l'entraînement visuel augmente la quantité de neurones immunoréactifs au c-Fos dans toutes les couches corticales et principalement dans la couche IV. Chez ces animaux, l'équilibre exciteur/inhibiteur a été évalué dans les différentes couches grâce à des marquages cellulaires. Les animaux VS/HDB ont été comparés aux animaux HDB, c'est-à-dire ceux n'ayant été stimulés que cholinergiquement. L'équilibre E/I tend à être plus élevé dans la couche II/III des animaux VS/HDB, ce qui correspond à une augmentation de l'activité des neurones RBPC comparativement aux cellules PV-CR. Le contraire s'observe dans la couche V/VI où on y observe une diminution de l'équilibre, reflétant une forte activation des neurones GABAergiques. Finalement, la balance E/I dans la couche IV s'est révélée être identique entre les deux groupes.

III.2. Techniques de cartographies utilisées

La technique d'immunohistochimie est utilisée depuis le début des années 1940 (Coons et al., 1941). Elle permet de visualiser certains composants cellulaires *in situ* tels les lipides ou encore des protéines cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires. Il s'agit d'un excellent un outil diagnostique pour visualiser les tumeurs ou encore les cellules cancéreuses (ou inhabituelles). Dans un autre ordre d'idées, elle est aussi un excellent complément aux études comportementales. Dans le cas présent, elle a permis de visualiser à l'échelle cellulaire les modifications au niveau de l'activité de différents types cellulaires.

L'autre technique d'imagerie qui a été utilisée dans le cadre de ce mémoire est l'imagerie optique des signaux intrinsèques. La technique mesure les changements de réflectance de la lumière éclairant le cortex et ces variations sont dûes aux changements du volume sanguin, de la concentration de désoxyhémoglobine et de la dispersion de la lumière sur le tissu (la variation de cette dispersion donne un indice du débit sanguin) (Grinvald et al., 1986a, Frostig et al., 1990). La contribution relative des sources métaboliques et vasculaires permettant de déterminer les signaux intrinsèques dépend de la longueur d'onde choisie à l'illumination corticale (Frostig et al., 1990). Bien sûr, à l'instar des autres techniques de neuroimagerie, l'ISI dépend du couplage spatial serré entre activité vasculaire/métabolique et l'activité neuronale et l'utilisation d'une longueur d'onde d'autour de 600nm permet de visualiser cette activité. En effet, la baisse initiale dans le signal capté provient d'une diminution rapide du ratio oxy-/désoxy-hémoglobine et est ce qui est utilisé dans cette étude. En contrepartie, la remontée du signal correspond plutôt à une augmentation du ratio oxy-/désoxy-hémoglobine qui est moins localisé à l'activité neuronale (Frostig et al., 1990, Vanzetta and Grinvald, 1999). L'ISI est donc une bonne technique qui fournit un bon échantillonnage spatial de la population neuronale. Évidemment, les récepteurs muscariniques sont présents au niveau des vaisseaux sanguins et font varier le débit sanguin local par leur liaison à l'ACh qui régule ainsi la perfusion de plusieurs organes. Malgré que les cinq types de mAChRs soient présents au niveau des vaisseaux sanguins, c'est le récepteur M3 qui s'est avéré être le plus abondant. Ainsi, c'est ce récepteur qui médie la

vasodilatation cholinergique au niveau des muscles squelettiques, de la rétine, des reins et de la peau, les récepteurs M1 et M5 ne produisant aucun effet (Gericke et al., 2011a, Gericke et al., 2011b).

Chez le rongeur, il semble que les cellules des couches plus superficielles sont plus sélectives aux stimuli visuels que les cellules des couches profondes et donc que les neurones de V1 possèdent les propriétés nécessaires à la perception visuelle précise malgré leur faible résolution spatiale (Girman et al., 1999). Toutefois, étant donné que l'imagerie des signaux intrinsèques ne permet pas de séparer les couches, l'observation faite ici prend en considération l'intégration des différentes couches.

III.3. Induction d'une plasticité chez l'adulte

La plasticité du cortex visuel primaire chez l'adulte est impliquée dans le traitement et la distribution corticale de l'information visuelle. L'implication du système cholinergique dans la formation d'une plasticité chez l'adulte ne portera que sur la portion immunohistochimie de la deuxième étude présentée (voir fig. 5 de la section II.2.1.), laissant ainsi à l'auteur principal le soin de décrire plus en détail les résultats de son article lors de la rédaction de sa thèse.

L'intérêt se portait ici sur l'évaluation de l'induction d'une activité cellulaire dans V1 à long-terme. Une manière couramment utilisée pour étudier ces modifications est la lésion rétinienne et l'observation à la zone de projection corticale (LPZ) des propriétés neuronales. Chez le singe adulte qui a subi une lésion rétinienne, cette réorganisation est très limitée, du moins dans les mois suivant l'atteinte (Smirnakis et al., 2005). Chez le chat, 1 mois suivant une lésion rétinienne, l'observation du marquage c-Fos au niveau du cortex visuel primaire permet de voir à la LPZ une baisse de la régulation intracellulaire de c-Fos dans les noyaux (intensité du marquage), mais pas une diminution du nombre de noyaux marqués. Qui plus est, les couches infragranulaires présentent une augmentation du nombre de neurones immunoréactifs au c-Fos et le recrutement de cette population neuronale infragranulaire

pourrait avoir une fonction de protection contre une neurodégénération de la voie rétine-cortex (Hu et al., 2010). Aussi, suite à une lésion rétinienne, les neurones présents au niveau de la LPZ de V1 ont un délai de leur réponse d'activation plus long qui est supprimé par les réponses des neurones hors de la LPZ qui ne sont pas affectés (Palagina et al., 2009). Ce phénomène serait dû aux connexions corticales horizontales qui joueraient un rôle central dans la réorganisation fonctionnelle et pourraient aussi être impliquées dans les phénomènes d'augmentation de l'activité cellulaire tel qu'il est ici observé.

III.3.1. Évaluation de l'activité corticale à l'aide du marquage c-Fos

Il a clairement été démontré que chez les animaux qui reçoivent une stimulation visuelle, le marquage c-Fos est présent au niveau de la couche IV du cortex visuel primaire (Dotigny et al., 2008). Ce marquage est accru chez ceux ayant reçu un entraînement double cholinergique/visuel à la fois dans la couche IV, mais aussi dans toutes les autres couches corticales de V1. Cet enrichissement cortical de cellules activées a été évalué selon l'immunoréactivité des cellules au RBPC, un marqueur des cellules pyramidales, et à PV-CR, marqueurs de types GABAergiques. Chez l'adulte, l'organisation corticale est constante mais peut être modifiée par l'expérience sensorielle. Par exemple, une stimulation d'une heure chez des chats habitués au noir induit c-Fos dans le cortex visuel (Rosen et al., 1992), mais il s'agit d'une activation cellulaire aiguë.

Les effets corticaux de l'ACh dépendent grandement de sa concentration et le type de stimulation ici utilisé ne permet pas de contrôler la quantité d'ACh libérée au niveau de V1. Évidemment, la stimulation électrique de la HDB n'est pas spécifique à l'activation cholinergique, elle peut potentiellement aussi activer les projections non-cholinergiques. Toutefois, d'après les résultats obtenus, il semble clair que la plasticité induite provient de l'activation du système cholinergique, l'ACh étant en mesure de faciliter la réponse corticale à un stimulus visuel par un mécanisme ressemblant fortement à la LTP et impliquant les récepteurs muscariniques et nicotiques de l'ACh (Kang and Vaucher, 2009).

Finalement, l'expression de c-Fos dans les différentes portions des voies visuelles varie beaucoup en fonction de l'intensité, de la fréquence et de la sorte de stimulus employé. Il existe aussi beaucoup de projections entre les hémisphères (projections calleuses), et ce pourrait être une indication de la raison pour laquelle certains animaux présentaient un marquage c-Fos dans l'hémisphère n'ayant pas été stimulé.

III.3.2. Variation de l'équilibre excitateur/inhibiteur

Au niveau du cortex du rat, il existe trois grandes classes de neurones GABAergique; ceux immunoréactifs à la parvalbumine, à la calrétinine et à la somatostatine. Lorsqu'un neurone est immunoréactif pour l'un de ces marqueurs, il ne l'est pas pour les autres. Il s'agit en fait de familles distinctes. C'est pourquoi dans l'expérience, deux des marqueurs principaux des cellules GABAergiques furent utilisés. En effet, jusqu'à 20% des neurones GABAergiques de la couche II/III sont de type CR (Gonchar and Burkhalter, 1997, 2003). De plus, ce sont les neurones PV de la couche IV qui reçoivent principalement les afférences thalamocorticales (Staiger et al., 1996).

L'activité rencontrée dans les couches corticales des animaux VS/HDB implique à la fois la microcircuiterie inhibitrice (I) et excitatrice (E). Ainsi, le ratio d'excitation sur inhibition (E/I) donne une indication importante sur les changements effectués chez ces animaux et permet ainsi de déterminer les changements plastiques ayant lieu dans le cortex. Ce ratio est équivalent chez les deux groupes dans la couche IV mais ce qui devient intéressant est que dans la couche V/VI, le ratio E/I est plus important chez les rats HDB comparativement aux rats VS/HDB ce qui correspond à plus grande activité excitatrice des neurones RBPC activés comparativement aux c-Fos-PV-CR. Cela amène à croire que cet équilibre est à la base spécifique aux différentes couches et que la combinaison de la stimulation visuelle et cholinergique est en mesure de modifier la plasticité corticale (Gandhi et al., 2008, Morishita et al., 2010)

L'inhibition intracorticale est d'ailleurs décisive à l'induction d'une plasticité expérience-dépendante dans le cortex visuel adulte. Certaines molécules sont nécessaires à la plasticité lors du développement et permettent au cerveau adulte de maintenir son intégrité (Morishita et al., 2010). Au demeurant, une réduction de la transmission GABAergique dans le cortex visuel adulte de rat est en mesure de réactiver partiellement la plasticité de la dominance oculaire en réponse à une privation monoculaire, le tout accompagné d'une augmentation de l'efficacité synaptique (Harauzov et al., 2010). Donc, la modification de l'équilibre exciteur/inhibiteur permet de restituer la plasticité visuelle.

Les récepteurs muscariniques jouent aussi des rôles dans la plasticité corticale. En effet, le blocage des récepteurs M1 induit une augmentation de la conductance excitatrice sans toutefois modifier la conductance inhibitrice. Cela démontre que le récepteur M1 est localisé au niveau des neurones glutamatergiques et que son activité diminue suite à la relâche de glutamate. Les récepteurs M2/M4 sont localisés au niveau de ces neurones et modulent la relâche glutamatergique mais ils sont aussi présents au niveau des interneurones GABAergiques. Toutefois, il existe des différences au niveau même de la région corticale, car au niveau du cortex auditif, les neurones PV expriment le récepteur M2 tandis que les interneurones CR ne l'expriment pas (Chaudhuri et al., 2005). L'application d'un antagoniste du récepteur M3 diminue la conductance inhibitrice, et cela démontre que le récepteur M3 est localisé sur les interneurones GABAergiques et que son activation accroît la relâche de GABA (Amar et al., 2010).

III.4. Évidences de l'implication du système cholinergique dans le développement cortical

Les récepteurs muscariniques sont fortement impliqués dans plusieurs fonctions du SNC incluant les processus cognitifs de haut niveau. De plus, les niveaux d'ACh synaptique sont directement régulés par l'activité pré-synaptique des autorécepteurs muscariniques qui inhibent la relâche d'ACh. Les mAChRs jouent aussi un rôle important au niveau de la

plasticité synaptique de l'hippocampe qui est grandement impliqué dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage. Dans des coupes corticales de l'hippocampe de souris ou chez les souris M1-KO, lorsqu'une faible concentration de carbachol est appliquée, le renforcement de la transmission synaptique excitatrice normalement obtenu de la LTP disparaît. Cet effet est conservé chez les souris M3-KO (Shinoe et al., 2005). L'activation du récepteur M1 est le mécanisme cholinergique principal de la modulation de l'entrée du calcium par les canaux sensibles au voltage Ca^{+} dans les neurones épineux. Cela produit une facilitation post-synaptique de même qu'une inhibition GABAergique pré-synaptique. L'infusion intracorticale d'un agent antagoniste du récepteur M1 réduit la plasticité de la dominance oculaire suite à une privation monoculaire chez le chat (Gu, 2002). Le récepteur M2 est plus présent au niveau des axones plutôt que les dendrite, ce qui fait que la délétion du M2 produit une relâche d'ACh corticale (Zhang et al., 2002a, Disney et al., 2006). L'autoinhibition de l'ACh par les récepteurs M2 et M4 varie selon l'emplacement cérébral. Le M2 est actif principalement au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral et M4 dans le striatum (Zhang et al., 2002a).

III.4.1. Influence des lignées

L'absence des différents sous-types de récepteurs muscariniques cause des modifications de l'organisation du système visuel chez la souris adulte, l'accent ici étant mis sur l'organisation fonctionnelle. Les souris qui ont été utilisées provenaient de deux souches distinctes (voir matériel et méthodes). Donc, deux souches témoins ont été utilisées. Néanmoins, les tests statistiques en vue d'une possible combinaison des groupes témoins ont été effectués. Les résultats obtenus ont démontré qu'il n'était pas possible de réunir les souris en un seul et même groupe d'où le fait qu'il n'est aucunement possible dans ce cas-ci de comparer tous les groupes entre eux. En effet, les souris M2/M4 double KO ne peuvent être comparées aux groupes M1 et M1/M3 KO. Il semble donc que la souche ait un impact fondamental sur l'organisation corticale. En effet, différentes souches de souris ont été testées dans le water maze. Si l'on considère que la souris C57/BL6 possède une acuité

visuelle normale, plusieurs souches ont toutefois des acuités inférieures (Wong and Brown, 2006). La souche de souris EsEv n'étant pas couramment utilisée afin d'étudier les propriétés corticales possède des caractères d'organisation corticale normaux différents des souris de souches C57BL/6 qui sont normalement employées lors de ces études.

Finalement, malgré un âge similaire entre les WT, les M1 et les M1/M3 KO, ces dernières étaient de plus faible poids. En effet, il a été observé que le récepteur M1 est grandement impliqué dans les fonctions locomotrices (leur hyperactivité affecte leur prise de poids), mais est peu critique au niveau des processus cognitifs (Miyakawa et al., 2001b). Toutefois, les souris ont toutes été utilisées à un âge similaire, et il a été démontré que l'âge a un impact direct sur les facultés visuelles en produisant une diminution de la réponse corticale et donc de la fonction visuelle (Lehmann et al., 2012).

III.4.2. L'absence des mAChRs ne produit pas de modifications des propriétés de l'organisation générale du cortex occipital

Au niveau même de l'organisation visuelle corticale, le cortex visuel primaire de la souris ne semble avoir pour seule organisation que la rétinotopie (Bonin et al., 2011). Toutefois, les connections entre le CGL et le cortex sont précises et c'est durant la première semaine post-natale que se forme la cartographie thalamocorticale par les ondes d'activité rétinienne spontanée (Cang et al., 2005b). L'activité neuronale joue un rôle crucial dans l'élaboration de ces connectivités. Toutefois, les propriétés structurelles du cortex visuel ne semblent pas affectées chez nos KO. En effet, ni la surface de V1 qui est activée ou encore sa forme ne sont modifiées. L'absence des différents récepteurs muscariniques n'engendre donc pas de modifications dans la formation de l'organisation générale de V1 lors du développement cérébral. Les mécanismes généraux de projection thalamocorticale et cortico-corticale ne semblent pas particulièrement affectés tandis que la précision des connections le serait. Peut-être qu'en fait, la plasticité synaptique qui définit ici l'organisation fonctionnelle de V1 a lieu par l'activité muscarinique qui proviendrait de la quantité d'inputs cholinergiques inadéquate mais pas des inputs thalamiques.

III.4.3. L'absence des mAChRs provoque des modifications des propriétés fonctionnelles du cortex occipital

Les différents sous types de récepteurs muscariniques de l'acétylcholine sont connus comme étant des régulateurs de plusieurs fonctions du SNC. Néanmoins, leurs rôles exacts dans la modulation des propriétés corticales visuelles ne sont pas bien connus. Ainsi, cette section met en évidence par une étude *in vivo* l'importance de ces récepteurs dans l'organisation développementale du cortex visuel primaire chez la souris. Étant donné l'utilisation du modèle KO, ce qui est observé dans cette étude est l'impact sur la circuiterie corticale de l'absence chronique des mAChRs.

Les membres de la famille des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (M1-M5) sont au centre de plusieurs fonctions physiologiques et la privation visuelle néonatale affecte l'expression normale des récepteurs muscariniques dans le cortex visuel primaire. De plus, lors de l'application d'antagonistes muscariniques, la plasticité corticale visuelle est compromise (Lauder and Schambra, 1999). Il convenait donc d'évaluer l'impact de leur délétion sur les capacités visuelles adultes. Il est à noter que la délétion d'un gène codant pour un mAChR spécifique dans différents tissus n'affecte pas l'expression des autres mAChRs (Hamilton et al., 1997, Gomeza et al., 1999, Yamada et al., 2001).

La distribution des mAChRs a été évaluée dans la rétine du lapin et leur activation ainsi que leur inactivation sur les propriétés des réponses rétiniennes ont été évaluées. Les cinq types de mAChRs se sont révélés être présents au niveau des cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires de la rétine. L'activation ou le blocage non-spécifique par des agents cholinergiques de ces récepteurs amène l'augmentation ou la suppression de certaines réponses rétiniennes. Par exemple, l'application d'un antagoniste a produit une augmentation de l'activité des CGRs ON et ON-OFF et la suppression de la réponse des cellules OFF. Le système cholinergique dans ce tissu pourrait donc contribuer à l'intégration de stimuli complexes. (Strang et al., 2010). Les différents tissus du corps

peuvent exprimer plus qu'un seul sous-type de récepteur muscarinique qui sont chacun couplés à des effecteurs intracellulaires et qui ont donc des rôles physiologiques différents.

À titre d'exemple, au niveau du collicule inférieur (noyau auditif) chez le rat, la modulation muscarinique de la transmission GABAergique provient aussi principalement du récepteur M3. En effet, les autres sous-types de récepteurs muscariniques ainsi que les récepteurs nicotiques n'y participeraient pas de manière importante. Cette activation des récepteurs M3 provoquerait la relâche de GABA par les interneurons et cette relâche médiée par M3 serait importante pour la maturation inhibitrice des synapses en développement (Yigit et al., 2003).

Il faut aussi comprendre que la plasticité visuelle est régulée à la fois par l'âge et l'expérience visuelle, mais aussi par l'activation d'une kyrielle de molécules et récepteurs dont les mAChRs. Cette étude présente un tableau de l'impact de ces récepteurs durant le développement postnatal par l'évaluation in vivo chez l'animal adulte KO des propriétés corticales. Une autre façon d'étudier les récepteurs est en les séparant, soit par inactivation ou par application d'antagonistes spécifiques. Toutefois, un blocage aigu des récepteurs par l'utilisation d'antagonistes muscariniques ne présenterait sans doute pas les mêmes résultats étant donné que le phénomène d'adaptation est inhérent à la majorité des études utilisant les lignées KO.

III.4.3.1. Caractérisation de l'impact des mAChRs

Au niveau de V1, les champs récepteurs chez la souris ressemblent grandement à ceux du singe, c'est à dire avec un centre on et un pourtour inhibiteur (Van den Bergh et al., 2010). C'est dans le premier mois post-natal que s'effectuent chez le rongeur une grande partie de la croissance axonale et de la synaptogénèse. La plasticité semble être plus présente durant les périodes critiques (Hensch, 2005b) et est régulée entre autre par l'inhibition GABAergique. Pourtant cette maturation de la circuiterie inhibitrice varie selon l'espèce et la région cérébrale, et le ratio entre l'inhibition et l'excitation varie aussi selon la couche

corticale étudiée. La taille d'un champ récepteur est normalement définie par l'aire visuelle dans laquelle une cellule peut être activée. Puisque les connexions horizontales des cellules pyramidales sont longues, l'information est intégrée sur une large portion corticale (Gilbert and Wiesel, 1992, Pettet and Gilbert, 1992). Les champs récepteurs sont formés par des projections thalamocorticales précises (Buonomano and Merzenich, 1998). L'ACh est d'ailleurs impliquée dans leur modification et leur organisation (Delacour et al., 1990). En effet, l'application locale d'ACh ou d'agonistes des mAChRs est en mesure de modifier les propriétés des RFs des neurones de V1 (Ashe et al., 1989, McKenna et al., 1989). La présence durant la période critique d'une grande plasticité pourrait provenir d'une inhibition corticale inadéquate et donc d'une modification accrue de la balance excitatrice/inhibitrice. Ce remaniement de la taille des champs récepteurs chez les M1 et M1/M3 KO pourrait provenir de la rétine ou encore du GCL qui envoie des inputs visuels au niveau de V1. En effet, les changements observés pourraient être issus de modifications synaptiques intrinsèques au cortex par l'arborisation étendue des connexions latérales horizontales. Les récepteurs muscariniques se révèlent graduellement dans le cortex lors du développement. À la fin de la période prénatale (chez le rat du moins), la quantité des récepteurs M1, M2 et M3 est très faible comparativement à l'animal adulte. Puis entre les semaines 3 et 5, les niveaux de M1 et M3 atteignent les niveaux retrouvés chez l'animal mature tandis qu'il faut attendre plus tard que la semaine 5 pour retrouver les niveaux adultes du récepteur M2 (Aubert et al., 1996). D'ailleurs, chez les M1-KO, le degré de représentation visuelle est réduit tandis qu'il est augmenté chez les M2/M4-KO. Donc, les récepteurs M1, M2 et M4 seraient impliqués dans la représentation des inputs thalamocorticaux. Cela pourrait provenir d'une fonction pré-synaptique du récepteur M1 (bien que généralement post-synaptique) qui produirait une réduction de l'inhibition des connectivités latérales tandis que la délétion des autorécepteurs produirait une augmentation de la relâche corticale d'ACh (Mrzljak et al., 1996, Kimura and Baughman, 1997). Les récepteurs de l'acétylcholine sont présents dans le cortex avant la formation de la synaptogénèse qui débute vers la fin de la troisième semaine postnatale (Fagiolini et al., 1994) et sont donc impliqués dans la maturation neuronale (Bruehl-Jungerman et al., 2011). Donc si cette

maturation neuronale n'est pas complète ou aussi précise qu'elle le devrait, cela pourrait expliquer pourquoi les champs récepteurs de ces souris sont de plus petites tailles que ceux de leurs contrôles.

Les récepteurs de l'ACh étant donc importants dans les différentes régions du cortex en développement, l'implication des récepteurs muscariniques dans l'organisation des synapses lors du développement a été évaluée par la mesure du scatter (Cang et al., 2008b). Il n'y a que chez l'animal M2/M4-KO, qu'il est possible d'observer une diminution de la finesse des connectivités neuronales. Il a clairement été démontré à la fois par des études pharmacologiques et physiologiques que les récepteurs muscariniques pré-synaptiques aux terminaisons synaptiques sont impliqués dans la régulation de la libération d'ACh. Cette position pré-synaptique réduirait la probabilité de relâche vésiculaire (Rouse et al., 1999). En condition normale, l'activation du récepteur M2 aux terminaisons GABAergiques inhibe la relâche de GABA ce qui causerait une augmentation de la sensibilité corticale (Sarter et al., 2005, Sarter and Parikh, 2005). D'ailleurs, le récepteur M2 est présent au niveau des terminaisons synaptiques et non-synaptiques. En effet, M2 serait un autorécepteur cholinergique et sa distribution au niveau des terminaisons non cholinergiques en ferait un hétérorécepteur présynaptique (Rouse et al., 2000). Les différents récepteurs muscariniques influencent l'inhibition présynaptique (Fukudome et al., 2004, Perez-Rosello et al., 2005). Cette inhibition aurait comme effet de permettre une latéralisation des influx. Donc, l'absence des récepteurs M2 et M4 pourrait produire une connectivité plus élargie et donc moins précise (Salgado et al., 2007). D'ailleurs, au niveau cortical, la relâche d'ACh est principalement médiée par le récepteur M2 (Bymaster et al., 2003) et ses niveaux régulés par les mAChRs M2/M4 ainsi que par les enzymes de dégradations qui produisent un *feedback* négatif de la relâches d'ACh.

D'après les résultats obtenus, l'implication des récepteurs M1 et M3 dans la formation des différentes propriétés fonctionnelles visuelles semble différer légèrement. Le récepteur M1 se retrouve majoritairement dans le cortex cérébral tandis que M3 se retrouve dans plusieurs noyaux thalamiques (Hulme et al., 1990). De plus, dans la couche II/III de coupes

corticales visuelles d'animaux de 3-4 semaines, la formation d'une LTD ne dépend que du récepteur M1. Toutefois, chez l'adulte, le récepteur M3 est recruté et le blocage de M1 ou de M3 produit cette LTD (McCoy and McMahon, 2010).

Étant donné la compétition accrue entre l'inhibition et l'excitation lors de la période critique, qui est normalement le terrain de la maturation inhibitrice GABAergique, une hausse de l'excitation pourrait provoquer des modifications au niveau même de la synapse. D'après les résultats, l'absence du récepteur M1 provoque une augmentation de l'activité corticale. Pourtant, chez le chat qui a subi une lésion au niveau du noyau basalis magnocellulaire, près de la moitié des cellules présentaient une faible ou une absence de réponse visuelle (Sato et al., 1987a). Contraire à ce résultat, chez le rat qui subit une lésion cholinergique, il n'y a pas de perte d'acuité visuelle (Dotigny et al., 2008). Le type de lésion et l'espèce étudiée entrent donc en considération. De plus, la stimulation du BF chez le rat induit une facilitation de longue durée des potentiels évoqués visuels mais cet effet est aboli par le blocage des récepteurs muscariniques (Golmayo et al., 2003, Kang and Vaucher, 2009). En effet, l'ACh joue un rôle dans le traitement de l'information visuelle de V1 en contrôlant le taux de décharge des neurones lors d'une stimulation visuelle par les récepteurs muscariniques. Ceci a lieu dans toutes les couches corticales (Soma et al., 2012b). Le récepteur M1 présent sur les cellules épineuses aurait un effet sur la régulation pré-synaptique de diminution de la densité des fibres cholinergiques tout en produisant une facilitation post-synaptique. la relâche de GABA (inhibition) et ainsi que sur la facilitation post-synaptique (Perez-Rosello et al., 2005). Son absence pourrait ainsi contribuer à une augmentation de la relâche GABAergique et donc de l'inhibition corticale. Chez l'animal lésé cholinergiquement il n'y a normalement pas perte d'acuité visuelle (Dotigny et al., 2008). Comme le récepteur M1 est le plus présent au niveau du cortex visuel, et que ce sont les modifications développementales qui sont étudiées, il y a peut-être une compensation provenant des autres récepteurs ou encore une redondance fonctionnelle qui empêcherait un bouleversement dramatique des facultés visuelles chez ces souris.

Finalement, chez les souris M1/M3-KO, une diminution de la sensibilité au contraste ainsi qu'une légère augmentation de la sélectivité à la fréquence spatiale peuvent être observées. Toutefois, chez le tupaï, l'application d'un agoniste des récepteurs muscariniques augmente légèrement la sensibilité au contraste au niveau du cortex visuel (Bhattacharyya et al., 2012). Ce qui est observé ici est en fait l'inverse de ces observations. Évidemment, les performances visuelles rencontrées chez un animal sont influencées à la fois par des facteurs neuronaux mais aussi rétiniens. En effet, l'adaptation au contraste s'effectue aussi dans la rétine (Kim and Rieke, 2001, Baccus and Meister, 2002) qui exprime les cinq sous-types de mAChRs (McBrien et al., 2001). L'expérience ici ne permet pas de déterminer exactement où se produisent les altérations dans la chaîne rétino-corticale et donc, puisqu'il s'agit de propriétés acquises lors du développement de l'individu, la présence de phénomènes compensatoires ne peut être exclue.

Les récepteurs muscariniques semblent donc être significativement impliqués dans le développement cérébral en régulant la prolifération et la formation des synapses et ont clairement des impacts sur la formation normale des propriétés du cortex visuel primaire.

IV. Perspectives

La compréhension de la distribution et de la fonction des récepteurs muscariniques au niveau du cortex visuel primaire et des voies visuelles vise un potentiel thérapeutique majeur. En effet, plusieurs maladies causées par une diminution de la sécrétion ou de l'activité de l'acétylcholine ont comme impact des modifications visuelles. L'ACh est connue comme étant présente au niveau de la rétine, du cortex visuel et du collicule supérieur et les neurones cholinergiques provenant du BF se projettent dans le cortex cérébral en entier. La relâche corticale d'ACh au niveau du cortex occipital module le traitement de l'information visuelle. Par exemple, l'application d'antagonistes des récepteurs muscariniques a été étudiée dans l'objectif de réduire les impacts de la myopie, les récepteurs M1 et M4 seraient impliqués dans la progression de la maladie (Lin et al., 2009). Chez les patients atteints de certaines maladies affectant le SNC telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'épilepsie ou la schizophrénie, des dysfonctions de la transmission cholinergique seraient présentes. Cette transmission cholinergique par l'action des récepteurs muscariniques est impliquée dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage, mais entre aussi en jeu dans la vision, tel que démontré par les études présentées. En effet, chez les patients atteints d'Alzheimer, la quantité de récepteurs M1 est grandement réduite dans le cortex occipital (Rodriguez-Puertas et al., 1997). De plus, l'application de faibles doses d'ACh renforce la modulation de l'attention. Également, l'antagoniste des mAChRs, la scopolamine, réduit l'attention visuelle chez les singes, mais l'antagoniste des nAChRs, la mecamylamine, ne produit aucun effet (Herrero et al., 2008). Par exemple, dans la couche V de tranches de V1 de jeunes souris qui reçoivent une stimulation électrique, les mAChRs, et non les nAChRs, sont nécessaires à l'initiation d'une activité persistante (c'est un phénomène qui est durable même lorsque les récepteurs GABA et les récepteurs ionotropiques au glutamate sont bloqués) qui est normalement un processus impliqué dans la mémoire de travail (Rahman and Berger, 2011). Il importe donc d'étudier le système cholinergique afin de comprendre son implication corticale, son interaction avec les différents systèmes neuromodulateurs et éventuellement permettre de proposer des stratégies à potentiel thérapeutique où l'utilisation d'agents cholinergiques permettrait l'amélioration et la restauration des capacités visuelles et cognitives.

V. Difficultés rencontrées

Au début de ma maîtrise, l'objectif principal était de combiner l'imagerie optique et l'entraînement cholinergique et visuel tel que décrit précédemment. Pourtant, quelques problèmes se sont posés. En effet, lors des tests préliminaires, l'imagerie optique sur le cortex visuel du rat s'est avéré être un échec. Le signal obtenu était particulièrement bruité et les réponses obtenues lors de la transformation de Fourier se retrouvaient directement dans une très forte zone de meyer, qui pourrait correspondre au bruit du cœur et de la respiration. La figure 7 montre un exemple d'une carte rétinotopique obtenue chez la souris (A) comparativement à une carte obtenue chez le rat (B). Notez la pixellisation de l'image obtenue chez le rat qui correspond en fait à du bruit. Il n'était donc pas possible d'utiliser la technique avec le protocole de stimulation en continue pour évaluer les propriétés corticales visuelles des rats. De plus, le signal se dégradait très vite dans le temps, que les animaux soient ou non paralysés ou ventilés. Toutefois, dans d'autres cortex, tel le somatosensoriel, les cartes obtenues chez le rat sont de très bonne qualité. Il se peut en effet que la composante vasculaire due aux gros vaisseaux sanguins au niveau du cortex occipital prime sur la composante neuronale. Le modèle du rat a donc été abandonné et la maîtrise a été redirigée vers le modèle de la souris qui s'avérait à bien fonctionner en imagerie optique. De plus, nous avons la possibilité d'avoir des lignées KO pour différents récepteurs muscariniques et donc étudier leur implication dans l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire.

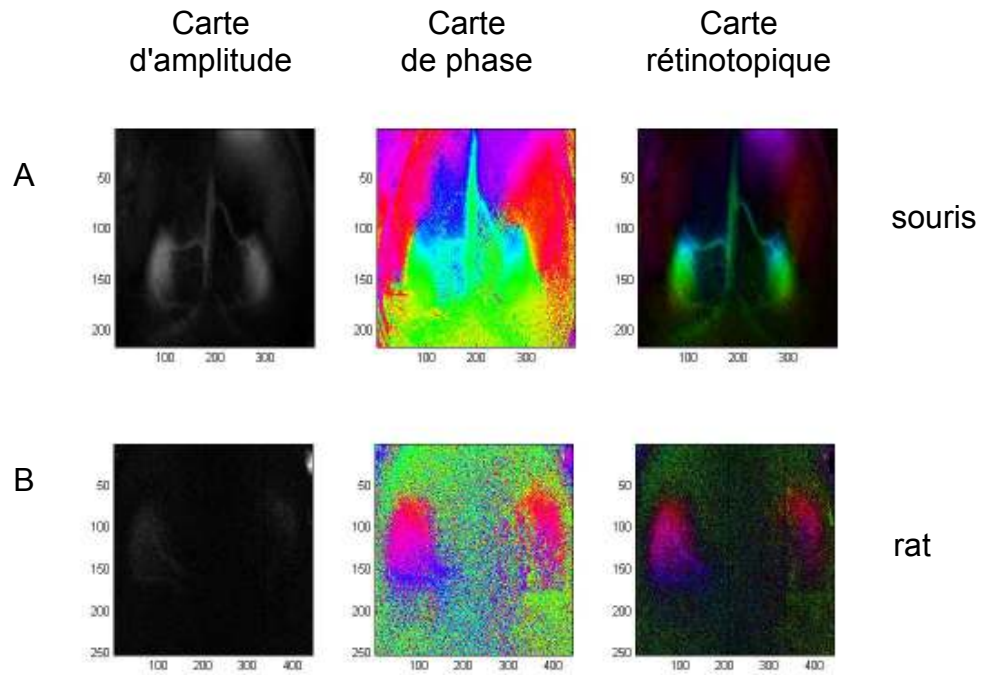


Figure 7. Distinction entre la rétinotopie chez la souris (A) et chez le rat (B). Ces deux cartes rétinotopiques sont typiques de celles obtenues chez la souris et chez le rat.

Si les découvertes scientifiques ont à la fois donné à l'humanité le pouvoir de créer et le pouvoir de détruire, alors elles sont en même temps un énorme défi et une grande épreuve

John Fitzgerald Kennedy

VI. Bibliographie

- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- Amar M, Lucas-Meunier E, Baux G, Fossier P (2010) Blockade of different muscarinic receptor subtypes changes the equilibrium between excitation and inhibition in rat visual cortex. *Neuroscience* 169:1610-1620.
- Ashe JH, McKenna TM, Weinberger NM (1989) Cholinergic modulation of frequency receptive fields in auditory cortex: II. Frequency-specific effects of anticholinesterases provide evidence for a modulatory action of endogenous ACh. *Synapse* 4:44-54.
- Aubert I, Cecyre D, Gauthier S, Quirion R (1996) Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:31-55.
- Aztiria E, Gotti C, Domenici L (2004) Alpha7 but not alpha4 AChR subunit expression is regulated by light in developing primary visual cortex. *J Comp Neurol* 480:378-391.
- Baccus SA, Meister M (2002) Fast and slow contrast adaptation in retinal circuitry. *Neuron* 36:909-919.
- Baxter MG, Bucci DJ, Sobel TJ, Williams MJ, Gorman LK, Gallagher M (1996) Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroreport* 7:1417-1420.
- Bear MF, Singer W (1986) Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* 320:172-176.
- Berman N, Cynader M (1972) Comparison of receptive-field organization of the superior colliculus in Siamese and normal cats. *J Physiol* 224:363-389.

- Bhattacharyya A, Biessmann F, Veit J, Kretz R, Rainer G (2012) Functional and laminar dissociations between muscarinic and nicotinic cholinergic neuromodulation in the tree shrew primary visual cortex. *Eur J Neurosci* 35:1270-1280.
- Bonin V, Histed MH, Yurgenson S, Reid RC (2011) Local diversity and fine-scale organization of receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci* 31:18506-18521.
- Brocher S, Artola A, Singer W (1992) Intracellular injection of Ca²⁺ chelators blocks induction of long-term depression in rat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:123-127.
- Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F (2011) Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res* 221:379-388.
- Buonomano DV, Merzenich MM (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual review of neuroscience* 21:149-186.
- Burkhalter A (1989) Intrinsic connections of rat primary visual cortex: laminar organization of axonal projections. *The Journal of comparative neurology* 279:171-186.
- Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J (2003) Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res* 28:437-442.
- Cang J, Kalatsky VA, Lowel S, Stryker MP (2005a) Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci* 22:685-691.
- Cang J, Niell CM, Liu X, Pfeiffenberger C, Feldheim DA, Stryker MP (2008a) Selective disruption of one Cartesian axis of cortical maps and receptive fields by deficiency in ephrin-As and structured activity. *Neuron* 57:511-523.

- Cang J, Renteria RC, Kaneko M, Liu X, Copenhagen DR, Stryker MP (2005b) Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron* 48:797-809.
- Cang J, Wang L, Stryker MP, Feldheim DA (2008b) Roles of ephrin-as and structured activity in the development of functional maps in the superior colliculus. *J Neurosci* 28:11015-11023.
- Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.
- Chalupa LM, Williams RW (2008) Eye, retina, and visual system of the mouse. Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Chaudhuri JD, Hiltunen M, Nykanen M, Yla-Herttuala S, Soininen H, Miettinen R (2005) Localization of M2 muscarinic receptor protein in parvalbumin and calretinin containing cells of the adult rat entorhinal cortex using two complementary methods. *Neuroscience* 131:557-566.
- Collier B, Mitchell JF (1966) The central release of acetylcholine during stimulation of the visual pathway. *J Physiol* 184:239-254.
- Consonni S, Leone S, Becchetti A, Amadeo A (2009) Developmental and neurochemical features of cholinergic neurons in the murine cerebral cortex. *BMC Neurosci* 10:18.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200–202.
- Dacey DM (2000) Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annu Rev Neurosci* 23:743-775.
- Dale HH (1914) Discussion on the Therapeutic Value of Hormones. *Proc R Soc Med* 7:34-40.

- Deco G, Thiele A (2011) Cholinergic control of cortical network interactions enables feedback-mediated attentional modulation. *The European journal of neuroscience* 34:146-157.
- Delacour J, Houcine O, Costa JC (1990) Evidence for a cholinergic mechanism of "learned" changes in the responses of barrel field neurons of the awake and undrugged rat. *Neuroscience* 34:1-8.
- Deutsch JA (1971) The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174:788-794.
- Disney AA, Domakonda KV, Aoki C (2006) Differential expression of muscarinic acetylcholine receptors across excitatory and inhibitory cells in visual cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *The Journal of comparative neurology* 499:49-63.
- Dori I, Parnavelas JG (1989) The cholinergic innervation of the rat cerebral cortex shows two distinct phases in development. *Exp Brain Res* 76:417-423.
- Dotigny F, Ben Amor AY, Burke M, Vaucher E (2008) Neuromodulatory role of acetylcholine in visually-induced cortical activation: behavioral and neuroanatomical correlates. *Neuroscience* 154:1607-1618.
- Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30:113-121.
- Drager UC (1975) Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 160:269-290.
- Drager UC (1978) Observations on monocular deprivation in mice. *J Neurophysiol* 41:28-42.
- Drager UC, Olsen JF (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191:383-412.

- Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J (1988) An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25:457-474.
- Egan TM, North RA (1986) Acetylcholine hyperpolarizes central neurones by acting on an M2 muscarinic receptor. *Nature* 319:405-407.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Berardi N, Domenici L, Maffei L (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res* 34:709-720.
- Ferrari M, Mottola L, Quaresima V (2004) Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 29:463-487.
- Fleming MD, Benca RM, Behan M (2006) Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience* 143:895-904.
- Fregnac Y, Schulz D (1988) [Synapses of Hebb and epigenesis of the visual cortex]. *Arch Int Physiol Biochim* 96:A175-177.
- Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, Grinvald A (1990) Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6082-6086.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *The European journal of neuroscience* 19:2682-2692.

- Gandhi SP, Yanagawa Y, Stryker MP (2008) Delayed plasticity of inhibitory neurons in developing visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:16797-16802.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *The Journal of comparative neurology* 293:103-124.
- Gericke A, Sniatecki JJ, Goloborodko E, Steege A, Zavaritskaya O, Vetter JM, Grus FH, Patzak A, Wess J, Pfeiffer N (2011a) Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:7479-7484.
- Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VG, Goloborodko E, Patzak A, Wess J, Pfeiffer N (2011b) Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1602-1608.
- Gianfranceschi L, Fiorentini A, Maffei L (1999) Behavioural visual acuity of wild type and bcl2 transgenic mouse. *Vision Res* 39:569-574.
- Gias C, Hewson-Stoate N, Jones M, Johnston D, Mayhew JE, Coffey PJ (2005) Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage* 24:200-206.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1992) Receptive field dynamics in adult primary visual cortex. *Nature* 356:150-152.
- Girman SV, Sauve Y, Lund RD (1999) Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 82:301-311.
- Goard M, Dan Y (2009) Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nature neuroscience* 12:1444-1449.

- Golmayo L, Nunez A, Zaborszky L (2003) Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neuroscience* 119:597-609.
- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999) Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1692-1697.
- Gonchar Y, Burkhalter A (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* 7:347-358.
- Gonchar Y, Burkhalter A (2003) Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci* 23:10904-10912.
- Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396.
- Grieve KL (2005) Binocular visual responses in cells of the rat dLGN. *J Physiol* 566:119-124.
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN (1986a) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324:361-364.
- Grinvald A, Segal M, Kuhnt U, Hildesheim R, Manker A, Anglister L, Freeman JA (1986b) Real-time optical mapping of neuronal activity in vertebrate CNS in vitro and in vivo. *Society of General Physiologists series* 40:165-197.
- Gu Q (2002) Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111:815-835.

- Gu Q (2003) Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 80:291-301.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13311-13316.
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci* 30:361-371.
- Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710-715.
- Hasselmo ME, Stern CE (2006) Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends Cogn Sci* 10:487-493.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497:326-349.
- Hensch TK (2005a) Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol* 69:215-237.
- Hensch TK (2005b) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Herrero JL, Roberts MJ, Delicato LS, Gieselmann MA, Dayan P, Thiele A (2008) Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1. *Nature* 454:1110-1114.

- Hillman EM, Devor A, Bouchard MB, Dunn AK, Krauss GW, Skoch J, Bacsikai BJ, Dale AM, Boas DA (2007) Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *NeuroImage* 35:89-104.
- Hofbauer A, Dräger UC (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* 234:465-474.
- Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hubener M (2006a) Lifelong learning: ocular dominance plasticity in mouse visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 16:451-459.
- Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hubener M (2006b) Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nat Neurosci* 9:127-132.
- Hu TT, Van der Gucht E, Eysel UT, Arckens L (2010) Retinal lesions induce layer-specific Fos expression changes in cat area 17. *Exp Brain Res* 205:139-144.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN (1965) Receptive Fields and Functional Architecture in Two Nonstriate Visual Areas (18 and 19) of the Cat. *J Neurophysiol* 28:229-289.
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633-673.
- Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM (2008) Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neuroscience* 157:637-643.
- Kalatsky VA, Stryker MP (2003) New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38:529-545.
- Kandel ER, Squire LR (2000) Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science* 290:1113-1120.

- Kang JI, Vaucher E (2009) Cholinergic pairing with visual activation results in long-term enhancement of visual evoked potentials. *PLoS One* 4:e5995.
- Kilgard MP, Merzenich MM (1998) Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science* 279:1714-1718.
- Kim KJ, Rieke F (2001) Temporal contrast adaptation in the input and output signals of salamander retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:287-299.
- Kimura F, Baughman RW (1997) Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77:709-716.
- Kimura F, Fukuda M, Tsumoto T (1999) Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: possible differential effect depending on the source of input. *Eur J Neurosci* 11:3597-3609.
- Kovacs KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20:665-672.
- Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* 17:1201-1211.
- Krnjevic K (2004) Synaptic mechanisms modulated by acetylcholine in cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145:81-93.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, et al. (1986a) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323:411-416.

- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, et al. (1986b) Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 209:367-372.
- Kuczewski N, Aztiria E, Gautam D, Wess J, Domenici L (2005a) Acetylcholine modulates cortical synaptic transmission via different muscarinic receptors, as studied with receptor knockout mice. *The Journal of physiology* 566:907-919.
- Kuczewski N, Aztiria E, Leanza G, Domenici L (2005b) Selective cholinergic immunolesioning affects synaptic plasticity in developing visual cortex. *The European journal of neuroscience* 21:1807-1814.
- Lamour Y, Dutar P, Jobert A, Dykes RW (1988) An iontophoretic study of single somatosensory neurons in rat granular cortex serving the limbs: a laminar analysis of glutamate and acetylcholine effects on receptive-field properties. *J Neurophysiol* 60:725-750.
- Laplante F, Morin Y, Quirion R, Vaucher E (2005) Acetylcholine release is elicited in the visual cortex, but not in the prefrontal cortex, by patterned visual stimulation: a dual in vivo microdialysis study with functional correlates in the rat brain. *Neuroscience* 132:501-510.
- Lauder JM, Schambra UB (1999) Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1:65-69.
- Lehmann K, Schmidt KF, Lowel S (2012) Vision and visual plasticity in ageing mice. *Restor Neurol Neurosci* 30:161-178.
- Levey AI (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life sciences* 52:441-448.

- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:3218-3226.
- Lin HJ, Wan L, Tsai Y, Chen WC, Tsai SW, Tsai FJ (2009) Muscarinic acetylcholine receptor 1 gene polymorphisms associated with high myopia. *Molecular vision* 15:1774-1780.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 446:17-29.
- Luiten PG, Gaykema RP, Traber J, Spencer DG, Jr. (1987) Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain research* 413:229-250.
- Mangini NJ, Pearlman AL (1980) Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 193:203-222.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience* 5:793-807.
- Mash DC, Potter LT (1986) Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19:551-564.
- McBrien NA, Cottrill CL, Annies R (2001) Retinal acetylcholine content in normal and myopic eyes: a role in ocular growth control? *Visual neuroscience* 18:571-580.
- McCoy PA, McMahon LL (2010) Sympathetic sprouting in visual cortex stimulated by cholinergic denervation rescues expression of two forms of long-term depression at layer 2/3 synapses. *Neuroscience* 168:591-604.

- McKenna TM, Ashe JH, Weinberger NM (1989) Cholinergic modulation of frequency receptive fields in auditory cortex: I. Frequency-specific effects of muscarinic agonists. *Synapse* 4:30-43.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Metin C, Godement P, Imbert M (1988) The primary visual cortex in the mouse: receptive field properties and functional organization. *Exp Brain Res* 69:594-612.
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (2001a) Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5239-5250.
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (2001b) Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 21:5239-5250.
- Moldestad O, Karlsen P, Molden S, Storm JF (2009) Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery. *Journal of neuroscience methods* 176:57-62.
- Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK (2010) Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* 330:1238-1240.
- Mrzljak L, Levey AI, Rakic P (1996) Selective expression of m2 muscarinic receptor in the parvocellular channel of the primate visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:7337-7340.

- Nathanson NM (2000) A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6245-6247.
- Neveu MM, Jeffery G (2007) Chiasm formation in man is fundamentally different from that in the mouse. *Eye (Lond)* 21:1264-1270.
- Niell CM, Stryker MP (2008) Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci* 28:7520-7536.
- Niell CM, Stryker MP (2010) Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron* 65:472-479.
- Nordman JC, Kabbani N (2012) An alpha7 nicotinic receptor-G protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *Journal of cell science*.
- Origlia N, Kuczewski N, Aztiria E, Gautam D, Wess J, Domenici L (2006) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. *J Physiol* 577:829-840.
- Origlia N, Kuczewski N, Pesavento E, Aztiria E, Domenici L (2008) The role of cholinergic system in neuronal plasticity: focus on visual cortex and muscarinic receptors. *Arch Ital Biol* 146:165-188.
- Paik SB, Ringach DL (2011) Retinal origin of orientation maps in visual cortex. *Nat Neurosci* 14:919-925.
- Palagina G, Eysel UT, Jancke D (2009) Strengthening of lateral activation in adult rat visual cortex after retinal lesions captured with voltage-sensitive dye imaging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8743-8747.
- Parnavelas JG, Kelly W, Franke E, Eckenstein F (1986) Cholinergic neurons and fibres in the rat visual cortex. *J Neurocytol* 15:329-336.

- Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. *Journal of neurophysiology* 93:2507-2519.
- Pettet MW, Gilbert CD (1992) Dynamic changes in receptive-field size in cat primary visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8366-8370.
- Polimeni JR, Granquist-Fraser D, Wood RJ, Schwartz EL (2005) Physical limits to spatial resolution of optical recording: clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4158-4163.
- Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Felder CC (2002) M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res* 944:82-89.
- Prusky GT, West PW, Douglas RM (2000) Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Res* 40:2201-2209.
- Quirion R, Aubert I, Lapchak PA, Schaum RP, Teolis S, Gauthier S, Araujo DM (1989) Muscarinic receptor subtypes in human neurodegenerative disorders: focus on Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:80-84.
- Rahman J, Berger T (2011) Persistent activity in layer 5 pyramidal neurons following cholinergic activation of mouse primary cortices. *The European journal of neuroscience* 34:22-30.
- Rand JB (2007) Acetylcholine. *WormBook* 1-21.
- Reese BE (1988) 'Hidden lamination' in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Res* 472:119-137.

- Ringach DL (2007) On the origin of the functional architecture of the cortex. *PLoS One* 2:e251.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 19:4337-4348.
- Rodriguez-Puertas R, Pascual J, Vilaro T, Pazos A (1997) Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse* 26:341-350.
- Rodriguez R, Kallenbach U, Singer W, Munk MH (2010) Stabilization of visual responses through cholinergic activation. *Neuroscience* 165:944-954.
- Rosen KM, McCormack MA, Villa-Komaroff L, Mower GD (1992) Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5437-5441.
- Rosner H, Fischer H (1996) In growth cones of rat cerebral neurons and human neuroblastoma cells, activation of protein kinase C causes a shift from filopodial to lamellipodial actin dynamics. *Neurosci Lett* 219:175-178.
- Rouse ST, Edmunds SM, Yi H, Gilmor ML, Levey AI (2000) Localization of M(2) muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 284:182-186.
- Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI (1999) Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life sciences* 64:501-509.
- Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L, Atzori M (2007) Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel

modulation through activation of PI3K/Ca²⁺ -independent and PLC/Ca²⁺ -dependent PKC. *Journal of neurophysiology* 98:952-965.

Sarter M, Bruno JP (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain research Brain research reviews* 23:28-46.

Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* 48:98-111.

Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature reviews Neuroscience* 6:48-56.

Sato H, Hata Y, Hagihara K, Tsumoto T (1987a) Effects of cholinergic depletion on neuron activities in the cat visual cortex. *Journal of neurophysiology* 58:781-794.

Sato H, Hata Y, Masui H, Tsumoto T (1987b) A functional role of cholinergic innervation to neurons in the cat visual cortex. *Journal of neurophysiology* 58:765-780.

Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M (2002) Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci* 22:6549-6559.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T (2005) Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25:11194-11200.

Siciliano R, Fontanesi G, Casamenti F, Berardi N, Bagnoli P, Domenici L (1997) Postnatal development of functional properties of visual cortical cells in rats with excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons. *Visual neuroscience* 14:111-123.

Siegel JA, Park BS, Raber J (2011a) Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure on cognitive function in adolescent mice. *Behav Brain Res* 219:159-164.

- Siegel JA, Park BS, Raber J (2011b) Methamphetamine exposure during brain development alters the brain acetylcholine system in adolescent mice. *J Neurochem* 119:89-99.
- Sillito AM, Kemp JA (1983) Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain research* 289:143-155.
- Sinex DG, Burdette LJ, Pearlman AL (1979) A psychophysical investigation of spatial vision in the normal and reeler mutant mouse. *Vision Res* 19:853-857.
- Sirotin YB, Das A (2010) Zooming in on mouse vision. *Nat Neurosci* 13:1045-1046.
- Smirnakis SM, Brewer AA, Schmid MC, Tolias AS, Schuz A, Augath M, Inhoffen W, Wandell BA, Logothetis NK (2005) Lack of long-term cortical reorganization after macaque retinal lesions. *Nature* 435:300-307.
- Smith SL, Hausser M (2010) Parallel processing of visual space by neighboring neurons in mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 13:1144-1149.
- Soma S, Shimegi S, Osaki H, Sato H (2012a) Cholinergic modulation of response gain in the primary visual cortex of the macaque. *J Neurophysiol* 107:283-291.
- Soma S, Shimegi S, Osaki H, Sato H (2012b) Cholinergic modulation of response gain in the primary visual cortex of the macaque. *Journal of neurophysiology* 107:283-291.
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF (1996) Recurrent axon collaterals of corticothalamic projection neurons in rat primary somatosensory cortex contribute to excitatory and inhibitory feedback-loops. *Anat Embryol (Berl)* 194:533-543.
- Steinlein O (1998) New functions for nicotinic acetylcholine receptors? *Behavioural brain research* 95:31-35.

- Strang CE, Renna JM, Amthor FR, Keyser KT (2010) Muscarinic acetylcholine receptor localization and activation effects on ganglion response properties. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:2778-2789.
- Ts'o DY, Frostig RD, Lieke EE, Grinvald A (1990) Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging. *Science* 249:417-420.
- Van den Bergh G, Zhang B, Arckens L, Chino YM (2010) Receptive-field properties of V1 and V2 neurons in mice and macaque monkeys. *J Comp Neurol* 518:2051-2070.
- Van Hooser SD (2007) Similarity and diversity in visual cortex: is there a unifying theory of cortical computation? *Neuroscientist* 13:639-656.
- Van Hooser SD, Heimel JA, Nelson SB (2005) Functional cell classes and functional architecture in the early visual system of a highly visual rodent. *Prog Brain Res* 149:127-145.
- Vanni MP, Provost J, Lesage F, Casanova C (2010) Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *J Neurosci Methods* 189:138-150.
- Vanzetta I, Grinvald A (1999) Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286:1555-1558.
- Vanzetta I, Hildesheim R, Grinvald A (2005) Compartment-resolved imaging of activity-dependent dynamics of cortical blood volume and oximetry. *J Neurosci* 25:2233-2244.
- Volpicelli LA, Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145:59-66.

- von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H (2007) Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:5633-5642.
- Wang Q, Burkhalter A (2007) Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 502:339-357.
- Werner JS, Chalupa LM (2004) *The visual neurosciences*. Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 14:308-313.
- Wess J, Bonner TI, Brann MR (1990) Chimeric m2/m3 muscarinic receptors: role of carboxyl terminal receptor domains in selectivity of ligand binding and coupling to phosphoinositide hydrolysis. *Mol Pharmacol* 38:872-877.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *Journal of neurophysiology* 28:1060-1072.
- Wong AA, Brown RE (2006) Visual detection, pattern discrimination and visual acuity in 14 strains of mice. *Genes Brain Behav* 5:389-403.
- Wonnacott S (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92-98.
- Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J (2001) Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410:207-212.
- Yigit M, Keipert C, Backus KH (2003) Muscarinic acetylcholine receptors potentiate the GABAergic transmission in the developing rat inferior colliculus. *Neuropharmacology* 45:504-513.

- Zepeda A, Arias C, Sengpiel F (2004) Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *Journal of neuroscience methods* 136:1-21.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002a) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22:1709-1717.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002b) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:1709-1717.
- Zoli M, Le Novere N, Hill JA, Jr., Changeux JP (1995) Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 15:1912-1939.

