

Université de Montréal

**Projections du cortex visuel au claustrum de la souris :
reconstructions tridimensionnelles d'axones individuels.**

par Ève-Marie Frigon

Programme de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine
en extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biomédicales
option médecine expérimentale

Décembre, 2020

© Ève-Marie Frigon, 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Département d'anatomie

Ce mémoire intitulé

**Projections du cortex visuel au claustrum de la souris : reconstructions
tridimensionnelles d'axones individuels**

Présenté par

Ève-Marie Frigon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mathieu Piché

Président-rapporteur

Denis Boire

Directeur de recherche

Stéphane Molotchnikoff

Membre du jury

Résumé

Le claustrum est une structure télencéphalique sous-corticale présente chez tous les mammifères. Il est réciproquement interconnecté avec tout le cortex cérébral. Le claustrum serait impliqué dans la synchronisation d'oscillations corticales et le maintien de l'attention. Les projections corticales sensorielles au claustrum de la souris forment des bandes longitudinales dédiées à chaque modalité sensorielle, qui peuvent également se chevaucher. Actuellement, il n'y a aucune étude de la morphologie des axones des projections corticales au claustrum. Les paramètres quantitatifs morphométriques des axones uniques permettent de comprendre comment l'information est distribuée à l'intérieur d'une structure. Pour visualiser les axones de la projection visuelle au claustrum, des injections iontophorétiques du traceur neuronal antérograde, la leucoagglutinine *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) ont été réalisées dans le cortex visuel de souris adultes C57BL/6J. La révélation immunohistochimique du PHA-L a été réalisée pour reconstruire les axones individuels des projections des cortex visuels au claustrum en utilisant NeuroLucida 360 (MBF Biosciences). Ces projections ont été montrées dans la région centrale le long de l'axe dorso-ventral du claustrum ipsi- et controlatéral. Il y a trois types de morphologie des axones : certains parcourent toute la longueur du claustrum sans ramification, d'autres sont longs et branchés, et d'autres sont courts. Les arborisations locales pourraient suggérer des modules plus petits au sein de l'organisation longitudinale du claustrum. Certaines collatérales de l'axone sortent du domaine visuel central pour se ramifier dans des domaines des autres modalités sensorielles. La projection du cortex visuel au claustrum est ainsi constituée d'axones dont la morphologie est peu diversifiée. Des axones individuels acheminent l'information sur toute l'étendue rostro-caudale du claustrum. La bifurcation des axones suggère que l'information visuelle peut être acheminée vers des territoires de d'autres modalités sensorielles dans le claustrum. La distribution des varicosités suggère que les contacts synaptiques s'établissent aléatoirement tout au long du trajet des axones.

Mots-clés : Claustrum, axones, connexions, multisensoriel, cortex visuel

Abstract

The claustrum is a subcortical telencephalic structure present in all mammals. It is widely and reciprocally interconnected with the entire cerebral cortex. It has been suggested to be involved in the synchronization of cortical oscillations and in attention. The claustrum in mice exhibits a clear dorsoventral organization of longitudinal bands dedicated to different sensory cortical projections, that can also overlap. Presently, there are no studies of the cortical projections to the claustrum at the single axon level. Single axon quantitative morphometric parameters help understanding how information is distributed within a structure and how it interacts with the entire brain. To reveal axons of the visual cortex projection to the claustrum, iontophoretic injections of the anterograde neuronal tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) were performed in the visual cortex of adult C57BL/6J mice. Individual axons of the projections from the visual cortices to the claustrum were reconstructed using NeuroLucida 360 (MBF Biosciences). These projections were shown in central region of the dorsoventral axis in the ipsi- and contralateral claustra. There were three morphological types of axon: some traveled all the length of the claustrum without significant branching, some were long and branched, and others were short. Local arborizations might suggest smaller modules within the longitudinal organization of the claustrum. Some collaterals of the main axon exit the central visual domain to branch into other sensory modalities. The visual projection to the claustrum is formed by poorly diversified axon regarding to their morphology. Individual axons route the information through all the rostro-caudal length of the claustrum. Axonal bifurcations suggest that visual information can be directed to other territories associated to other sensory modalities. The varicosity distribution suggest that synapses are established randomly.

Keywords : Claustrum, axons, connections, visual cortex, multisensory

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de littérature – Le claustrum	4
1.1 Historique.....	5
1.1.1 La découverte.....	5
1.1.2 Le claustrum d’aujourd’hui.....	6
1.2 Anatomie.....	8
1.2.1 Situation et morphologie.....	8
1.2.2 Délimitations du claustrum et des structures adjacentes.....	10
1.2.3 Cytologie.....	13
1.2.4 Connectivité	14
1.3 Fonctions.....	24
1.3.1 Amplification et synchronisation corticale	24
1.3.2 Attention	26
1.3.3 Conscience	28
1.3.4 Autres fonctions	29
1.4 Objectifs de l’étude.....	34
1.4.1 Axones uniques.....	34
1.4.2 Hypothèses de recherche.....	35
Chapitre 2 : Méthodologie	37
2.1 Animaux.....	38

2.2 Aspects techniques de l'injection.....	39
2.2.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinine	39
2.2.2 Iontophorèse.....	41
2.3 Chirurgie	43
2.4 Histologie.....	46
2.5 Microscopie confocale	48
2.6 Analyse	50
Chapitre 3 : Projections of the visual cortex to the claustrum in the mouse, a single axon study	53
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Material and methods.....	57
Results.....	60
Discussion.....	72
Chapitre 4 : Résultats supplémentaires	79
4.1 Dendrogrammes	80
4.2 Autre axone et futur travail.....	84
Chapitre 5 : Discussion supplémentaire.....	87
5.1 Limites de l'étude	88
5.1.1 Le choix de l'espèce.....	88
5.1.2 Le type de microscopie	89
5.1.3 Le choix du traceur	90
5.2 La reconstruction d'axones et ses technologies	92
5.2.1 Pourquoi reconstruire des axones ?.....	92
5.2.2 Les méthodes technologiques de reconstructions d'axones.....	93
5.3 La connectivité du claustrum	97
5.4 Futur travail.....	99
5.4.1 Importance des projections frontales	99
5.4.2 Hypothèses.....	100
Conclusion	101

Références bibliographiques	i
Annexe 1 : Contributions détaillées	xxiv
Annexe 2 : Articles publiés lors de la maîtrise	xxx

Liste des tableaux

Tableau I. Paramètres d'injections.....	45
Tableau II. Tableau des anticorps.....	47

Liste des figures

Figure 1. Nombre d'études publiées et répertoriées dans PubMed sur le claustrum par année.(Graphique tiré de pubmed).....	7
Figure 2. Coupe coronale d'un cerveau humain colorée à l'aide de la technique Woelke qui marque la myéline, avec insert sur le claustrum et les structures aux alentours.....	8
Figure 3. Coupe coronale d'un cerveau de souris avec coloration au NeuN	9
Figure 4. Schéma de la mince lame de matière grise de l'humain.....	10
Figure 5. Reconstruction tridimensionnelle schématique du claustrum de la souris	10
Figure 6. Immunohistochimie marquant la Gng2	11
Figure 7. Illustration du claustrum du rat avec expression de Parvalbumin.	13
Figure 8. Connectivité intra-claustrale des neurones du claustrum.....	16
Figure 9. Représentation schématique de la distribution des différentes projections corticales sensorielles dans l'axe dorso-ventral du claustrum	18
Figure 10. Représentation schématique des projections de 42 aires corticales vers le claustrum de la souris.....	20
Figure 11. Représentation schématique des projections ipsilatérales (A) et controlatérales (B) du claustrum et du cortex cérébral chez la souris.....	22
Figure 12. Diagramme des relations d'oscillations entre le cortex et le claustrum.....	25
Figure 13. Représentation schématique du rôle des connexions cortico-claustrales des cortex préfrontaux, moteurs, somatosensoriels, et sensoriels dans l'attention	27
Figure 14. Schémas qui illustrent les hypothèses du présent projet.	36
Figure 15. Souris C57BL/6J.....	38
Figure 16. Représentation schématique des différentes sortes de transports axonaux.....	40
Figure 17. Schéma d'une pipette remplie d'un traceur ionisé.....	42
Figure 18. Incision du scalp et dévoilement du crâne et des sutures bregma et lambda qui servent de repères anatomiques importants	44
Figure 19. Injection par iontophorèse lors d'une chirurgie stéréotaxique.....	45
Figure 20. Sites d'injections dans les cortex visuels des spécimens.	45
Figure 21. Photographies de myéline (MBP+, magenta) et des corps neuronaux (NeuN+, bleu) à 10X avec délimitations du claustrum en jaune	48

Figure 22.	Représentation tridimensionnelle des photo-montages 3D acquis avec le microscope spinning disk DSU en Alexa 488	49
Figure 23.	Étapes de reconstruction d'axones par le logiciel NeuroLucida360	51
Figure 24.	Dendrogrammes des 22 axones reconstruits.....	83
Figure 25.	Sites d'injections de souris où la cible était les cortex frontaux pour des résultats supplémentaires.....	84
Figure 26.	Résultats de la reconstruction tridimensionnelle d'un axone provenant des cortex frontaux cingulaires/infralimbique vers le claustrum ipsilatéral.....	86
Figure 27.	Photographie à partir du microscope spinning disk DSU (A) versus à partir du microscope laser confocal (B)	89
Figure 28.	Quatre exemples des 37 axones listés dans le NeuronBrowser du MouseLight de Janelia Research Campus.....	96
Figure 29.	Schéma de connectivité intraclaustrale et la distribution des axones du cortex dans le claustrum.....	98

Liste des sigles et abréviations

Etc. : Et cætera

Ex. : Exemple

Fig. : Figure

Min. : Minute

AAV : associated adenovirus (Adénovirus associés)

AP : Antéro-postérieur

BDA : Amines de dextran biotinylées

CLA : Claustrum

CO : Cytochrome oxydase

dCLA : Claustrum dorsal

DV : Dorso-ventral

Gng2 : G protein gamma 2 subunit

Gnb4 : Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4

LSFM : Light-sheet fluorescence microscopy

MAPseq : Multiplexed Analysis of Projections by Sequencing

MBP : Myéline (Myelin basic protein)

MCL : Microscopie confocale laser

METH : Méthamphétamine

ML : Médio-latéral

NeuN : Neuronal biomarker

NL : NeuroLucida

Ntng2 : Netrin G2

PAF : Paraformaldéhyde

PHA-L : *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine

PB : Tampon phosphate (Phosphate-buffered)

PBS : Tampon phosphate avec NaCl (Phosphate-buffered saline)

PV : Parvalbumin

RE : Réticulum endoplasmique

AIRES CORTICALES :

Au : Cortex auditif

CPu : Caudé putamen

DEn : Noyau endopiriforme dorsal

ECT : Cortex ectorhinal

IC : Cortex insulaire

IL : Cortex infralimbique

MOp : Cortex moteur primaire

MOs : Cortex moteur secondaire

ORB : Cortex orbital

S1 : Cortex somatosensoriel primaire

S2 : Cortex somatosensoriel secondaire

TEa : Cortex temporal associatif

vCLA : Claustrum ventral

VISa : Aire visuel antérieur

VISal : Aire visuel antéro-latéral

VISam : Aire visuel antéro-médial

VISli : Aire visuelle latéro-intermédiaire

VISp : Aire visuelle primaire

VISpl : Aire visuelle postéro-latérale

VISpm : Aire visuelle postéro-médiale

VISpor : Aire visuelle postrhinale

VISrl : Aire visuelle rostro-latérale

WM : White matter (Matière blanche)

V1 : Cortex visuel primaire

V2L : Cortex visuel secondaire latéral

V2M : Cortex visuel secondaire médial

À mon cher grand-père, qui m'a offert son stylo d'or pour l'écriture de ce mémoire

Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs personnes à qui je souhaite adresser ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Denis Boire, pour la confiance qu'il m'a dédîée en la réalisation de ce projet et pour m'avoir soutenue à travers toutes les étapes de ce mémoire. Sa patience, sa rigueur et sa disponibilité m'ont guidé durant les trois dernières années à travailler avec lui. Dr. Boire m'a aussi offert des opportunités d'enseignement ainsi que des congrès internationaux qui auront sans aucun doute un énorme impact sur ma carrière et je lui serai pour ces raisons toujours reconnaissante.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers Dr. Céline Van Themsche, membre du comité de parrainage, pour m'avoir soutenue tout au long de la rédaction de mon mémoire et pour m'avoir guidé dans la réalisation de mes projets personnels.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire, notamment Robert Tremblay-Laliberté pour son temps lors de ma formation, ainsi que Jolanie Roy et Bruno Oliveira Ferreira de Souza dans l'assistanat de certaines expériences.

Je souhaite aussi remercier toute l'équipe du département d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Merci également à Nadia Desnoyers pour son dévouement, sa collaboration et son aide précieuse en animalerie. Merci aussi à Dr. Marc Germain pour sa disponibilité et son aide en imagerie confocale.

Je n'oublie pas les membres de ma famille qui m'ont soutenue tout au long de mes études. Ils ont cru en moi et m'ont donné la chance d'effectuer des études supérieures avec un support incroyable. Mes remerciements s'adressent également à mon copain Mathieu, Justine, Sarakim et Megan pour leur amitié et soutien inestimable.

Enfin, ce projet n'aurait pas pu avoir lieu sans le soutien financier du Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) et du Conseil de recherches en sciences naturelles et génie (CRSNG).

Introduction

Le claustrum est une mince couche de matière grise située entre le cortex insulaire et le putamen, présent bilatéralement dans le cerveau de tous les mammifères (Edelstein & Denaro, 2004). La morphologie du claustrum varie entre les espèces, mais il est reconnu comme un groupe de neurones dense, localisé dans une région moins myélinisée que les structures voisines (Wang *et al.*, 2017). Puisqu'il est très petit et situé profondément entre la capsule externe et extrême de la matière blanche, il est très difficile à manipuler, et enregistrer son activité est aussi ardu (Haines, 2004). De plus, il est très difficile d'effectuer des lésions expérimentales ainsi que des injections de traceurs neuronaux ou autres composés dans le claustrum sans interférer ou déborder dans des structures adjacentes (Crick & Koch, 2005; Torgerson & Van Horn, 2014). Les marqueurs spécifiques au claustrum sont également peu nombreux (Mathur, 2014). Ainsi, ses fonctions demeurent encore largement méconnues. Malgré ces nombreuses difficultés, il a été suggéré qu'il jouerait un rôle dans l'amplification d'oscillations corticales (Smythies *et al.*, 2012), dans l'attention (Goll *et al.*, 2015) et la conscience (Crick & Koch, 2005).

Ces fonctions sont en lien avec la forte connectivité du claustrum; c'est la structure la plus interconnectée par unité de volume du cerveau (Torgerson *et al.*, 2015). Des études récentes ont montré que le claustrum maintient des connexions réciproques et directes avec presque toutes les régions corticales (Milardi *et al.*, 2013; Torgerson *et al.*, 2015; Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018). Il est aussi connecté avec plusieurs régions sous-corticales, dont le putamen, le globus pallidus et l'amygdale latérale (Pearson *et al.*, 1982; Park *et al.*, 2012; Milardi *et al.*, 2013; Torgerson *et al.*, 2015; Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018). Même si les projections corticales au claustrum sont généralement bilatérales, les connexions ipsilatérales sont habituellement plus fortes (Wang *et al.*, 2017).

Les projections des cortex sensoriels au claustrum suggèrent qu'il est divisé en différentes couches longitudinales dans l'axe dorso-ventral, qui seraient toutes spécifiquement associées à une modalité sensorielle. Plus précisément, les cortex auditif et visuel projettent vers le milieu du claustrum, alors que les projections olfactives et somatosensorielles/motrices se termineraient dans le claustrum ventral et dorsal respectivement. Les projections des cortex

préfrontaux semblent distribuées sur toute l'étendue dorso-ventrale du claustrum (Atlan *et al.*, 2017). Cependant, cette organisation des différentes connexions sensorielles n'a pas été étudiée à l'échelle d'axones uniques. Un des objectifs de l'étude est donc de mettre en lumière comment ce patron de projection émerge à partir de la structure d'axones individuels.

En effet, la connaissance détaillée des circuits neuronaux est essentielle à la compréhension des fonctions du claustrum (Crick & Koch, 2005). Depuis quelques années, plusieurs projets ont vu le jour afin de produire un connectome à l'échelle mésopique du cerveau de la souris tels le Mouse Brain Architecture Project (Bohland *et al.*, 2009), le Mouse Connectome Project et le Allen Mouse Brain Connectivity Atlas (<https://mouse.brain-map.org/>;(Oh *et al.*, 2014)). Ces travaux produisent des matrices de connectivité du cerveau, cependant les projections d'un ensemble de neurones révélées par des injections de traceurs neuronaux ne montrent pas les projections et la structure d'axones individuels. Plusieurs études montrent en effet qu'il y a une diversité de structures axonales des neurones qui proviennent d'une même région (Aransay *et al.*, 2015; Economo *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Kuramoto *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). De plus, la structure des axones semble refléter l'organisation intrinsèque des structures innervées (Bevan *et al.*, 1997; Parent, 2016b).

Malgré le fait que depuis peu la connectivité du claustrum à l'échelle mésopique est assez bien connue, il est important de pousser les recherches microscopiques qui sont présentement peu développées; il faut augmenter les recherches fondamentales sur les études d'axones uniques. Ces études permettent de comprendre la relation entre les collatérales de neurones dans un circuit et comment elles se comportent (<https://www.janelia.org/project-team/mouselight>). La visualisation d'axones uniques permet de mieux comprendre l'organisation fine des connexions par des paramètres morphométriques quantitatifs, comme le nombre, la grosseur et la forme des arborisations individuelles et de leurs varicosités. Cela permet aussi d'en apprendre plus sur certaines informations spatiales comme l'espacement entre les arborisations, la distribution laminaire, le branchement collatéral et la divergence spatiale. Ces données sont nécessaires pour comprendre la manière dont les structures interagissent ensemble, à partir des caractéristiques microstructurales. Cela permet aussi d'inférer à plus

grande échelle pour émettre un comparatif entre les structures et les différentes espèces (Rockland, 2002; 2020). La distribution des varicosités sur les axones uniques doit aussi être étudiée, permettant de connaître la connectivité synaptique probable de ces axones. À cette fin, l'étude d'axones uniques est requise; nous voulons les visualiser dans leur entièreté (arborisation, collatérales, terminaisons, varicosités) pour comprendre comment l'information est distribuée dans le claustrum.

Pour réaliser ces reconstructions, la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris*, un marqueur antérograde spécifique, a été injectée dans le cortex visuel de la souris pour marquer les projections axonales corticales au claustrum. Des reconstructions en trois dimensions ont été effectuées avec NeuroLucida 360 (MBF Biosciences), pour montrer comment les axones cheminent dans le claustrum et pour raffiner les connaissances sur la segmentation de cette structure. Les varicosités ont également été cartographiées pour évaluer la distribution probable des synapses de la projection visuelle corticale au claustrum. Cela apportera des connaissances sur la structure du claustrum, ce qui contribuera également à mieux comprendre ses fonctions.

Chapitre 1 : Revue de littérature – Le clastrum

1.1 Historique

1.1.1 La découverte

Le claustrum a été découvert par le médecin français Félix Vicq d'Azyr en 1786. Il a été reconnu comme des « petits points entre le cortex insulaire et la matière blanche ». À cette époque, la désignation de cette structure par le mot claustrum n'était pas en usage; il était seulement question « d'une trace de substance corticale entre le striatum et l'insula » (Johnson & Fenske, 2014). Il aurait en premier lieu nommé cette structure «nucleus taeniaeformis» en raison de sa forme, terme qui a été repris dans les années 1830 par Friedrich Arnold dans un livre de référence sur les structures anatomiques (Arnold, 1838). C'est en 1819 que l'allemand Karl Burdach a publié un livre décrivant une structure «Vormauern» en synonyme de «Claustrum», ou «Avant-mur» en français (Burdach, 2012). Le mot «claustrum» réfère depuis ce temps au claustrum dorsal, aussi appelé claustrum insulaire (Brodmann, 2006) et au claustrum ventral, aussi appelé le noyau endopiriforme (Loo, 1931).

Son nom lui a été attribué considérant qu'il est situé très profondément dans le cerveau et pris entre de grosses structures. Le mot claustrum est le mot latin pour «cloître» qui désigne un espace clos dans un monastère de Talin, représentant un pilier d'énergie : « Le cœur du monastère dominicain se composait jadis de trois ailes, dont l'ensemble formait la clôture (Claustrum), et dont seule subsiste aujourd'hui l'aile Est. Les visiteurs ne manqueront pas le mystérieux « Pilier de l'Énergie », dans le cellier, que certains considèrent comme une source de santé physique et spirituelle (Tallin, 2019) ». L'appellation « Pilier d'énergie » a sans doute un lien avec ses fonctions, alors que la traduction de claustrum signifie «caché», «clôture», «renfermé»; on peut penser au préfixe claustro, chez les claustrophobes, qui ont peur des endroits clos et renfermés (Larousse, 2019).

La découverte des colorations de Golgi, Nissl, Weigert et Marchi, a grandement aidé à délimiter les frontières du claustrum, à comprendre sa dérivation cellulaire et a permis les premières découvertes de connectivité du claustrum. La coloration de Golgi permet d'observer les neurones avec leurs dendrites et leur axone (Golgi, 1873). Cette coloration a montré que le claustrum ne faisait pas partie du cortex, puisque les cellules étaient très différentes (Ramon y Cajal, 1900). Cependant, la coloration de Nissl, qui marque les corps cellulaires neuronaux

(Nissl, 1894) a mené Brodmann à affirmer que le claustrum était en réalité la couche 6c du cortex insulaire (Brodmann, 2006). Cette affirmation a donc engendré un débat entre Cajal et Brodmann, à savoir si le claustrum était de dérivation corticale ou subcorticale. Cette question sera abordée dans les sections suivantes sur l'anatomie du claustrum. La coloration de Weigert, quant à elle, qui marque la myéline, a permis de bien délimiter le claustrum des capsules extrême et externe de la matière blanche (Weigert, 1885).

L'avènement de ces colorations a permis de proposer différentes subdivisions du claustrum. Initialement, il a été séparé en claustrum dorsal, supérieur à la fissure rhinale, juste en profondeur du cortex insulaire et en claustrum ventral, juste sous la fissure, adjacent au cortex olfactif (Johnson & Fenske, 2014). Le terme claustrum ventral a été remplacé par le noyau endopiriforme (Loo, 1931). Il a longtemps été considéré comme une partie du claustrum, mais des études plus récentes de sa connectivité ont permis de différencier les deux régions (Behan & Haberly, 1999). Le noyau endopiriforme est maintenant connu comme une structure distincte à celle du claustrum, ce qui sera décrit dans la section 1.2.2 sur les délimitations du claustrum des structures adjacentes.

1.1.2 Le claustrum d'aujourd'hui

Le claustrum demeure très difficile à étudier malgré les technologies maintenant disponibles; en effet, il est situé très profondément, donc difficile à atteindre pour des injections ou pour enregistrer son activité (Haines, 2004). De plus, pour étudier les fonctions d'une structure, l'inactivation de celle-ci permet de faire le lien avec la réponse physiologique perdue. Les problèmes cliniques pouvant engendrer l'inactivation du claustrum sont très rares. En effet, le claustrum étant bilatéral, effectuer des lésions dans les deux claustra sans l'engagement des structures adjacentes est pratiquement impossible. Le claustrum est aussi localisé dans une région vascularisée à la fois par l'artère cérébrale moyenne supérieure et inférieure. La perte de la vascularisation du claustrum est donc pratiquement impossible (Crick & Koch, 2005).

La structure, la connectivité et les fonctions du claustrum sont longtemps demeurées peu connues pour plusieurs raisons. En plus de la rareté des lésions répertoriées, les marqueurs spécifiques au claustrum, qui pourraient permettre de l'inactiver chimiquement ou pharmacologiquement, sont également peu nombreux (Mathur, 2014). Les injections de traceurs

au claustrum doivent également être très précises en raison de sa petite taille (Crick & Koch, 2005), ce qui est très difficile à obtenir sans la diffusion du traceur hors des limites de cette structure (Torgerson & Van Horn, 2014).

Les avancées technologiques en neurosciences ont permis de mettre à jour la connectivité du claustrum et l'élaboration de plusieurs hypothèses fonctionnelles. Par exemple, l'arrivée de la technique silver degeneration stains (Nauta & Gyax, 1954; Fink & Heimer, 1967); les colorants, les ligands et les traceurs neuronaux (Schwab *et al.*, 1978); le PHA-L (Wouterlood *et al.*, 1987); les molécules fluorescentes (Kuypers *et al.*, 1977); les microélectrodes (Graybiel & Devor, 1974); et la microscopie électronique (Gray, 1959), sont toutes des techniques qui ont permis de mieux étudier le cerveau et par le fait même, le claustrum. En effet, la plupart des études sur la connectivité du claustrum ainsi que sa physiologie sont apparues dans les dix dernières années, après qu'il y a eu un pic d'intérêt dans les années 80 (fig. 1). Ces études récentes ont permis d'élaborer plusieurs hypothèses fonctionnelles sur le claustrum, ouvrant ainsi plusieurs nouvelles pistes pour la recherche sur le claustrum. Ces études seront présentées dans les prochaines sections sur l'anatomie, la connectivité et les fonctions du claustrum.

Résultats par année

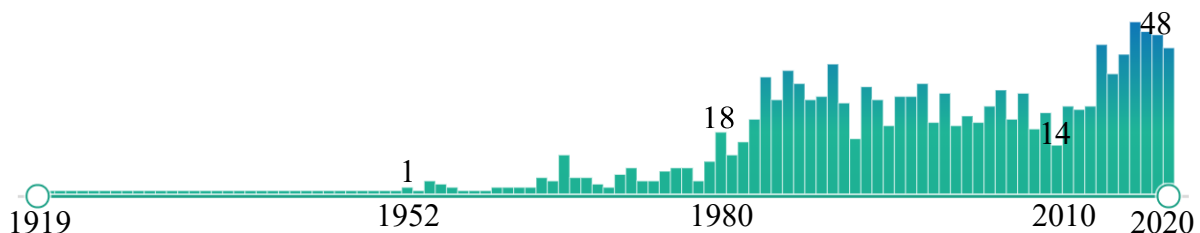


Figure 1. Nombre d'études publiées et répertoriées dans PubMed sur le claustrum par année. On voit la différence d'engouement dans la recherche sur le claustrum dans les différentes époques. Le graphique de pubmed montre très bien le pic dans les dernières années. Il y avait également un pic dans les années 80, suite aux publications de LeVay et Sherk sur le claustrum du chat (graphique tiré de pubmed).

1.2 Anatomie

1.2.1 Situation et morphologie

Le claustrum est une très petite structure télencéphalique sous corticale présente chez tous les mammifères. Il est situé très profondément dans le cerveau, entre le putamen et le cortex insulaire. Plus précisément, chez les primates, dont l'humain, (fig. 2) il est enchâssé entre la capsule externe médialement et la capsule extrême latéralement. Chez les rongeurs (fig. 3), la capsule extrême n'est pas existante, mais le claustrum se situe tout de même entre la capsule externe et le cortex insulaire (Edelstein & Denaro, 2004). Le claustrum rostral est positionné profondément sous les cortex orbitaux ventral et latéral chez le rat (Paxinos & Watson, 2005).

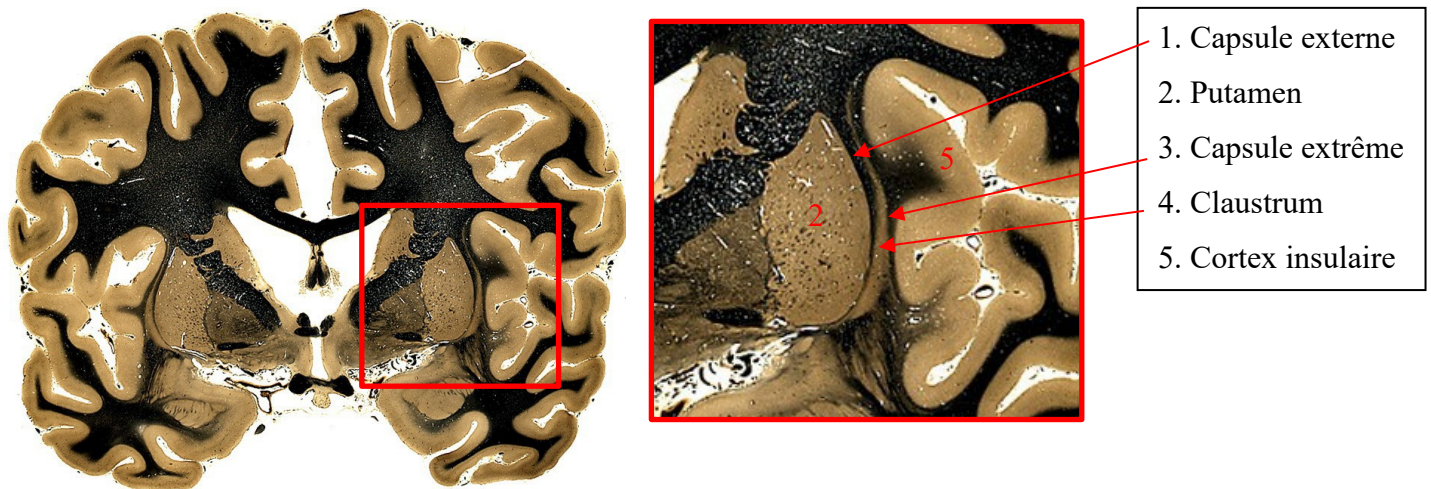


Figure 2. Coupe coronale d'un cerveau humain colorée à l'aide de la technique Woelke qui marque la myéline, avec insert sur le claustrum et les structures aux alentours. Modifiée de The Human Brain Atlas du Michigan State University (<http://brains.anatomy.msu.edu/brains/human/index.html>).

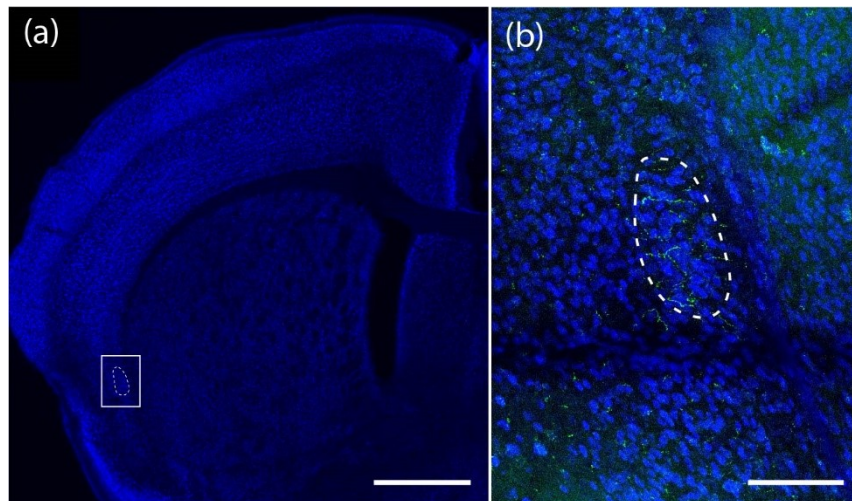


Figure 3. Coupe coronale d'un cerveau de souris avec coloration au NeuN (bleu) (A) Échelle = 1mm. On remarque le zoom de A sur le claustrum (B), délimité par les pointillés blancs, où les axones des projections visuelles sont marqués par PHA-L (vert). Échelle = 200 μ m.

Le claustrum s'étend sur toute la longueur rostro-caudale du striatum chez toutes les espèces étudiées à ce jour (Krettek & Price, 1977; Mathur, 2014; Patzke *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Dillingham *et al.*, 2019). Rostralement, il débute à la corne antérieure du striatum et s'arrête caudalement à la transition entre les cortex insulaire et rhinal (Dillingham *et al.*, 2019). Le claustrum est une mince lame de matière grise sous corticale avec une morphologie très irrégulière, étroite et courbée antérieurement (Sherk & LeVay, 1981; Mathur, 2014; Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018; Dillingham *et al.*, 2019). Chez les organismes dont le cortex est gyrencéphalique, le claustrum est très irrégulier, voir même d'allure «fripé», à cause des différentes circonvolutions du cerveau (fig. 4). Le claustrum du chat apparait quant à lui comme un noyau dense en forme de virgule (LeVay & Sherk, 1981). Chez les rongeurs, le claustrum est plutôt en forme de «banane» aplatie (voir figure 5 dans: Wang *et al.*, 2017). Dans cette figure, on observe le grossissement et la courbure du claustrum rostral. Malgré qu'il parcoure une grande distance dans le cerveau, il est clair que le claustrum est une très petite structure; le ratio volumétrique du claustrum de la souris est 1/200 alors qu'il est de 1/42 pour le chat (LeVay, 1986), ce qui démontre la petitesse de la structure.

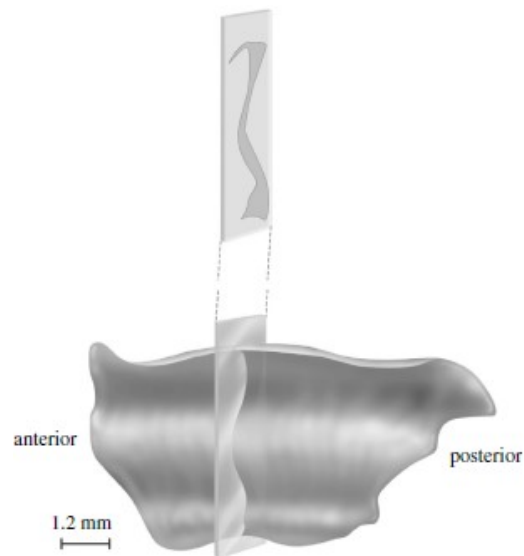


Figure 4. Schéma de la mince lame de matière grise de l'humain. On voit l'étendue rostro-caudale du claustrum, mais aussi une projection coronale dans le haut qui montre l'allure irrégulière du claustrum (Crick & Koch, 2005).

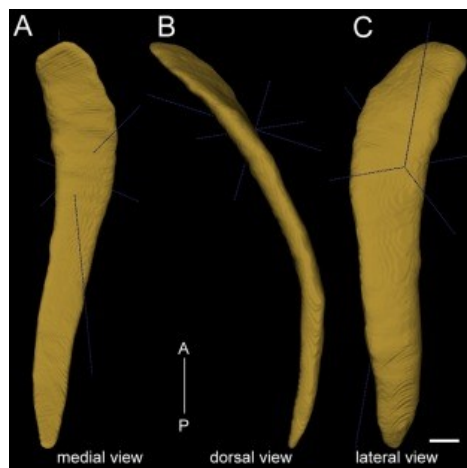


Figure 5. Reconstruction tridimensionnelle schématique du claustrum de la souris, dans tous les axes (Wang *et al.*, 2017).

1.2.2 Délimitations du claustrum et des structures adjacentes

Le claustrum est considéré comme une structure télencéphalique sous-corticale, dérivée de la couche 6 du cortex insulaire (Watson & Puellas, 2017; Bruguier *et al.*, 2020). Le développement de la structure est en réalité une dérivation du pallium latéral, tout comme

l'amygdale, et elle n'est donc pas considérée comme une structure corticale, puisque le néocortex dérive quant à lui, du pallium dorsal (Puelles *et al.*, 2000).

Le claustrum est maintenant distingué des structures voisines, puisqu'il forme un groupe très dense de neurones, qui se situe dans une région moins myélinisée que les structures adjacentes (Wang *et al.*, 2017). Il est possible de tracer ses frontières grâce à ces critères. De plus, le claustrum est plus riche en sous-unité gamma 2 de la protéine G (Gng2), en parvalbumin (PV), en cytochrome oxydase (CO) (Dillingham *et al.*, 2019), en Netrin G2 (Ntng2), en Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 (Gnb4) et en latexin (Wang *et al.*, 2017) que les structures adjacentes. Plus particulièrement, la Gng2 est riche dans les cellules PV+ du claustrum. Gng2/PV définit les bordures du claustrum du rat très facilement (fig. 6) (Mathur *et al.*, 2009).

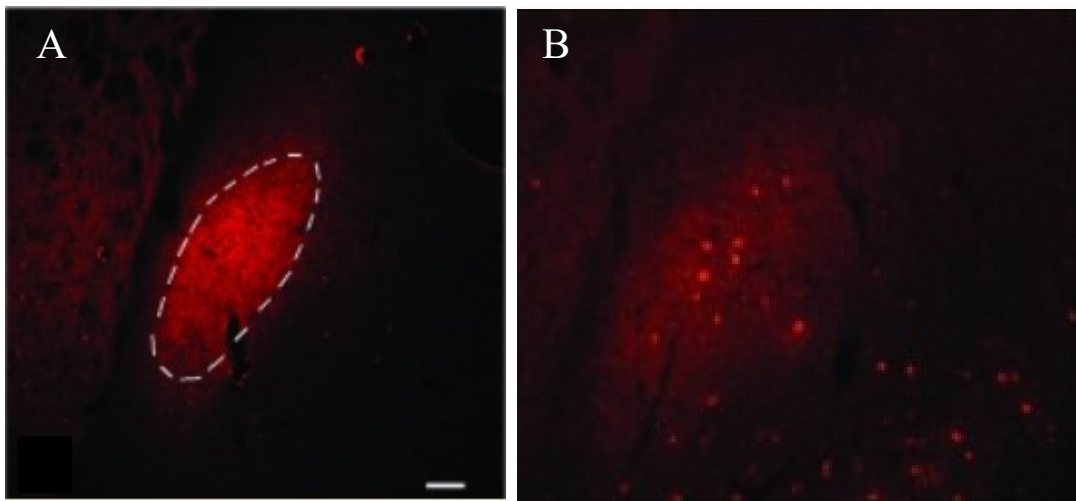


Figure 6. Immunohistochimie marquant la Gng2. Les pointillés blancs délimitent les bordures du claustrum (A). Neuropile dense en PV+ qui marque également le claustrum (B) (Mathur *et al.*, 2009).

Le claustrum est situé juste au-dessus du noyau endopiriforme, qui autrefois était considéré comme le claustrum ventral (Loo, 1931; Narkiewicz, 1964). Malgré la difficulté de délimitations claires entre le claustrum et le noyau endopiriforme à cause de leur proximité et leurs ressemblances cellulaires, des études montrent que ces structures sont distinctes et n'ont pas une dérivation embryologique commune (Bayer & Altman, 1991). Premièrement, le noyau endopiriforme contient plus de fibres myélinisées que le claustrum (Wang *et al.*, 2017).

Deuxièmement, le marquage à la PV est beaucoup plus intense dans le claustrum que dans le noyau endopiriforme (Wang *et al.*, 2017; Dillingham *et al.*, 2019). Troisièmement, comme pour les autres structures voisines du claustrum, le noyau endopiriforme a une expression de Ntn2, Gnb4, Gng2 et latexin plus faible que dans le claustrum (Wang *et al.*, 2017), ce qui permet encore une fois de bien discriminer le claustrum du noyau endopiriforme et de l'insula.

Malgré que le claustrum dérive de la couche 6 de l'insula, l'expression de la protéine cristallin mu (Crym) est faible dans le claustrum (Dillingham *et al.*, 2019) comparativement au cortex insulaire où elle est très dense, ce qui permet de bien distinguer ces régions. Également, la densité de Gng2 dans les couches profondes du cortex insulaire est faible, alors qu'elle est très riche dans le claustrum (Dillingham *et al.*, 2019), ce qui permet encore une fois de bien distinguer ces deux régions. Le claustrum est donc entouré de cortex, mais n'en fait pas partie.

Le claustrum a été divisé morphologiquement en deux parties, ventrale et dorsale. Le claustrum dorsal est adjacent au cortex insulaire, juste au-dessus de la fissure rhinale. Le claustrum ventral est situé juste en dessous de cette même fissure, adjacent au cortex olfactif. La distinction entre les deux se fait bien grâce aux mêmes gènes mentionnés précédemment, soit PV qui est présent en plus grande quantité dans le claustrum ventral, alors que Gng2 et Crym sont présents dans les deux régions du claustrum (fig. 7) (Dillingham *et al.*, 2019).

Ce qui est important à retenir de ces sections anatomiques, c'est que le claustrum est une mince lame de matière grise de morphologie irrégulière, qui chemine dans l'axe rostro-caudal tout au long du striatum. Également, le claustrum dérive de la couche 6 de l'insula, mais ne ferait pas partie du cortex. Il est aussi distinct du noyau endopiriforme, en plus d'être lui-même séparé en deux régions différentes, ventrale et dorsale, par plusieurs gènes d'intérêts.

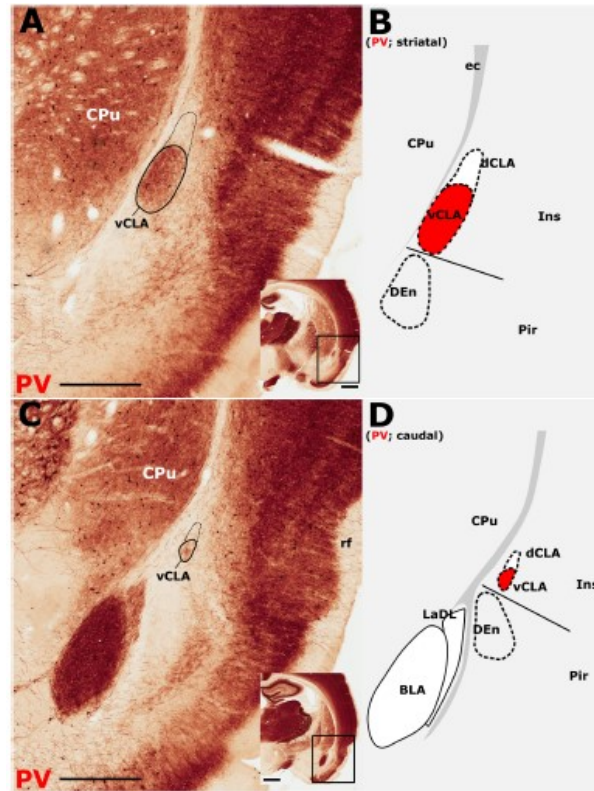


Figure 7. Illustration du claustrum du rat avec expression de Parvalbumin, dans son compartiment rostral (A et B) et son compartiment caudal (C et D). On observe bien la séparation entre le claustrum dorsal (dCLA), ventral (vCLA) et le noyau endopiriforme (DEn) et la différence de grosseur entre A/B et C/D (Dillingham *et al.*, 2019).

1.2.3 Cytologie

Le claustrum serait caractérisé par la présence de deux types de neurones principaux, soient les neurones de projection et les interneurones. Les neurones de projection ont beaucoup d'épines dendritiques, alors que les interneurones sont généralement non épineux (LeVay & Sherk, 1981; Qadir *et al.*, 2018). Les neurones de projections, considérés comme les cellules principales du claustrum (Clac) seraient en général glutamatergiques et excitatrices (Watakabe *et al.*, 2014). Les interneurones, quant à eux, seraient GABAergiques et inhibiteurs et pourraient exprimer la parvalbumin (PV+) (Watakabe *et al.*, 2014).

Ces types de neurones se trouvent chez plusieurs espèces étudiées, dont la souris (Kim *et al.*, 2016), le chat (LeVay & Sherk, 1981), le singe (Brand, 1981) et l'humain (Braak & Braak, 1982). La morphologie des neurones entre les espèces est comparable. Cependant, il y aurait une différence dans le dénombrement de types de neurones de projection et dans le nombre de

types d'interneurones (Brand, 1981; LeVay & Sherk, 1981; Braak & Braak, 1982; LeVay, 1986; Crick & Koch, 2005).

Il y a aussi dans le claustrum des interneurones qui expriment la somatostatine et le neuropeptide Y (Guirado *et al.*, 2003; Baizer *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2020). Également, le récepteur le plus exprimé dans le claustrum est le kappa opioïde, un récepteur à la protéine G (Mansour *et al.*, 1994a; Jackson *et al.*, 2020). De plus, il y a une grande quantité de récepteurs 5-HT₂ et il y a donc une innervation sérotoninergique importante (Baizer, 2001; Sitte *et al.*, 2017a; Jackson *et al.*, 2020).

Ce qui est important à retenir, c'est que le claustrum contient deux types de cellules, soient les interneurones inhibiteurs GABAergiques et les cellules ClaC glutamatergiques excitatrices, qui permettent une connectivité longitudinale et des échanges importants avec le cortex, ce qui sera décrit dans la section qui suit.

1.2.4 Connectivité

Le claustrum a une connectivité interne importante qui permet de transmettre des influx sur toute sa longueur rostro-caudale par une connectivité dendro-dendritique de ses cellules définies dans la section précédente. Le claustrum est également connu pour être la structure la plus interconnectée du cerveau par unité de volume (Torgerson *et al.*, 2015). Sa connectivité avec tout le cortex cérébral en particulier est très riche, bilatérale et réciproque (Crick & Koch, 2005; Torgerson *et al.*, 2015; Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018). Le claustrum est également en étroite relation avec plusieurs régions sous-corticales (Park *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018).

1.2.4.1 Connectivité intra-claustrale

Les cellules principales du claustrum (ClaC) sont distribuées de manière homogène sur toute la longueur de la structure (LeVay, 1986; Reynhout & Baizer, 1999; Patzke *et al.*, 2014). Bien que plusieurs études initiales suggéraient que ces neurones établissent un réseau interne de communication qui s'étend sur l'ensemble du claustrum (Brand, 1981; LeVay & Sherk, 1981; Braak & Braak, 1982; Druga *et al.*, 1993; Real *et al.*, 2003; Hinova-Palova *et al.*, 2007; Rahman & Baizer, 2007; Kim *et al.*, 2016), une étude récente suggère que les connexions directes entre

les cellules principales existent, mais sont très peu fréquentes (#1, fig.8) (Kim *et al.*, 2016). Les interneurons qui expriment la parvalbumin contribuent aussi à la connectivité interne du claustrum. Ces interneurons sont interconnectés entre eux par des synapses chimiques et électriques (#2, fig. 8), assurant ainsi une connectivité interne longitudinale, en plus d'établir des connexions réciproques avec les cellules ClaC du claustrum (#3, #5 fig. 8), ce qui engendre leur inhibition. Cette inhibition des cellules ClaC entraîne une dépression de l'activité de la projection claustrum-corticales par les ClaC (#4, fig. 8) (Kim *et al.*, 2016).

Finalement, les projections corticales vers le claustrum activent principalement les interneurons PV+ inhibiteurs (#6, fig. 8) qui eux, sont connectés aux cellules excitatrices principales du claustrum (ClaC) (#3, fig. 8) (Kim *et al.*, 2016). L'activation du claustrum engendre l'activation des interneurons PV+, ce qui cause l'inhibition des cellules ClaC excitatrices, ce qui engendre une diminution de l'activité glutamatergique excitatrice des cellules ClaC vers les cellules pyramidales corticales par des connexions feedback du claustrum au cortex (#4, fig. 8) (Jackson *et al.*, 2020).

En bref, cette connectivité longitudinale grâce aux connexions dendro-dendritiques des cellules PV+ en plus de l'interaction avec les ClaC au sein du claustrum permettraient une connectivité intrinsèque longitudinale (Behan & Haberly, 1999; Smith & Alloway, 2010; Watson *et al.*, 2017) qui pourrait faciliter la synchronisation de l'activité au sein du claustrum, lui permettant ensuite d'amplifier les oscillations corticales, grâce à la projection des cellules ClaC au cortex. Cette hypothèse fonctionnelle importante, qui se base sur la connectivité interne du claustrum ainsi que sa boucle de projection avec le cortex sera décrite dans la prochaine section 1.3 (Jackson *et al.*, 2020).

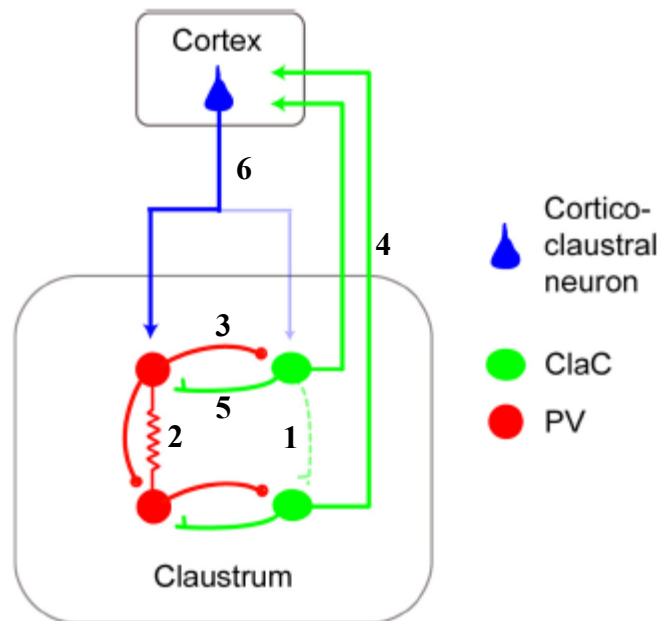


Figure 8. Connectivité intra-claustrale par les deux types principaux de neurones du claustrum, soit les neurones qui expriment la parvalbumin (PV+, en rouge) et les neurones principaux (ClaC, en vert) (Kim *et al.*, 2016).

1.2.4.2 Connectivité cortico-claustrale

La description des connexions cortico-claustrales ci-dessous concerne les rongeurs, notre espèce d'intérêt dans le présent projet, mais la connectivité du claustrum est assez conservatrice chez les mammifères (Crick & Koch, 2005; Buchanan & Johnson, 2011). Comme mentionné précédemment, la plupart des aires corticales sont réciproquement connectées avec le claustrum. Le cortex projette bilatéralement aux claustra, mais plus fortement vers le claustrum ipsilatéral que vers le claustrum controlatéral (Norita, 1977; Cortimiglia *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2017). De plus, les projections corticales au claustrum semblent topographiques. En effet, les cortex plus caudaux projettent au claustrum caudal, alors que les cortex plus frontaux projettent au claustrum rostral (Edelstein & Denaro, 2004).

Les projections corticales au claustrum (fig. 10 et 11) les plus fortes proviennent principalement des aires frontales, dont les cortex orbitofrontal, prélimbique, infralimbique, cingulaire et le cortex moteur secondaire (MOs), alors que les projections des cortex sensoriels sont plus faibles (Smith & Alloway, 2010; Wang *et al.*, 2017; White *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2020). Les projections des cortex prélimbiques et infralimbiques sont situées dans toute l'étendue rostro-caudale des deux claustra, mais sont plus denses

ipsilatéralement. Le cortex moteur primaire (MOp) ne projette pas au claustrum (ce qu'on voit dans les figures 10 et 11 de Wang et al est dû au débordement du site d'injection). Cependant, le MOs montre une projection plus forte vers le claustrum controlatéral qu'ipsilatéral, ce qui est contradictoire avec la plupart des projections du cortex vers le claustrum qui sont plus denses ipsilatéralement (Wang *et al.*, 2017). Les cortex cingulaires, quant à eux, projettent très fortement sur tout l'axe dorso-ventral des claustra bilatéraux. Les cortex rétrospléniaux projettent dans le tiers antérieur du claustrum ipsilatéral, et sa projection controlatérale est très dispersée (Wang *et al.*, 2017).

Les cortex visuels VISpm, VISam, VISrl, VISal, VISpl, VISpor et VISli projettent bilatéralement, mais plus densément ipsilatéralement. Le marquage est plus dense dans la portion postérodorsale du claustrum ipsilatéral en provenance de VISp, VISpm, VISal, dans la portion dorsale en provenance de VISam et VISrl, et dans toute l'étendue rostro-caudale en provenance de VISpl, VISli et VISpor. Le cortex visuel primaire projette au claustrum ipsilatéral exclusivement, alors que la projection du cortex visuel secondaire est plus dense et bilatérale (Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Chez la souris, les projections sensorielles du cortex au claustrum seraient assez faibles et distribuées en compartiments longitudinaux distincts pour chaque modalité sensorielle (fig. 9). La partie dorsale serait somatosensorielle et motrice, la partie intermédiaire, visuelle et auditive, et la partie ventrale, olfactive. Les projections des cortex préfrontaux chevaucheraient tous ces compartiments longitudinaux. D'ailleurs, ces différents compartiments pourraient se chevaucher entre eux (Atlan *et al.*, 2017).

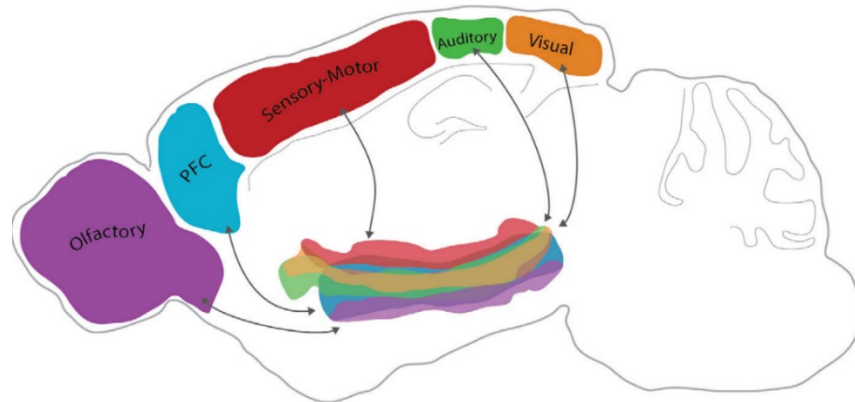


Figure 9. Représentation schématique de la distribution des différentes projections corticales sensorielles dans l'axe dorso-ventral du claustrum (Atlan *et al.*, 2017)

Les projections corticales au claustrum du chat et des rongeurs proviennent principalement des cellules de la couche 2/3 et 5 (frontal, temporal, pariétal), et aussi de neurones pyramidaux de la couche 6 de certains cortex (cortex sensoriels primaires) (Olson & Graybiel, 1980; Sherk & LeVay, 1981; Katz, 1987; Grieve & Sillito, 1995; Smith & Alloway, 2010; 2014; Brown *et al.*, 2017). En effet, les projections visuelles au claustrum proviendraient de neurones pyramidaux de la couche 6 (Carey *et al.*, 1980; Sherk & LeVay, 1981). Quelques projections proviendraient des couches 3 et 4, ou très peu de la couche 5 (LeVay & Sherk, 1981). Cela confirme le travail qui a été fait également chez le toupaye (Carey *et al.*, 1980; Day-Brown *et al.*, 2017). Cependant, très peu de ces cellules de la couche 6 du cortex des chats (4-10%) sont dédiées à projeter vers le claustrum (Katz, 1987; Grieve & Sillito, 1995).

Malgré le fait que la connectivité semble assez conservatrice d'une espèce à l'autre, il est évident qu'elle peut différer sous certains angles, surtout pour les projections sensorielles, étant donné que l'importance et la signification biologique de chaque modalité sensorielle varient chez les différents mammifères. Comme il s'agit d'une étude des projections du cortex visuel vers le claustrum de la souris dans le présent projet, il est important de donner une brève description de ces projections connues chez d'autres espèces. Les projections visuelles au claustrum du rat (Smith & Alloway, 2010; White *et al.*, 2017), du furet (Patzke *et al.*, 2014), du toupaye (Carey *et al.*, 1980), du chat (LeVay & Sherk, 1981), du cochon d'inde, du lapin (Jakubowska-Sadowska *et al.*, 1998) et du primate (Remedios *et al.*, 2010) ont été étudiées. Il faut noter que ces projections peuvent différer entre ces espèces (Jackson *et al.*, 2020).

Premièrement, les projections visuelles au claustrum du chat semblent fortes (LeVay & Sherk, 1981), alors que chez les rongeurs et les primates, ces projections sont faibles (Smith & Alloway, 2014). Deuxièmement, des différences d'organisation dorso-ventrale et rostro-caudale des projections visuelles sont retrouvées entre la souris, le chat et le singe. En effet, les projections visuelles au claustrum de la souris seraient situées dans le milieu du claustrum (Atlan *et al.*, 2017), alors qu'elles sont retrouvées dans la partie dorso-caudale du chat (Sanides & Buchholtz, 1979; LeVay & Sherk, 1981) et dans la portion ventrale du claustrum du singe (Remedios *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que l'organisation des projections cortico-claustrales dans le claustrum est spécifique à chaque espèce, ce qui pourrait être relié aux différences dans l'importance de la vision entre les rongeurs et les primates par exemple (Jackson *et al.*, 2020).

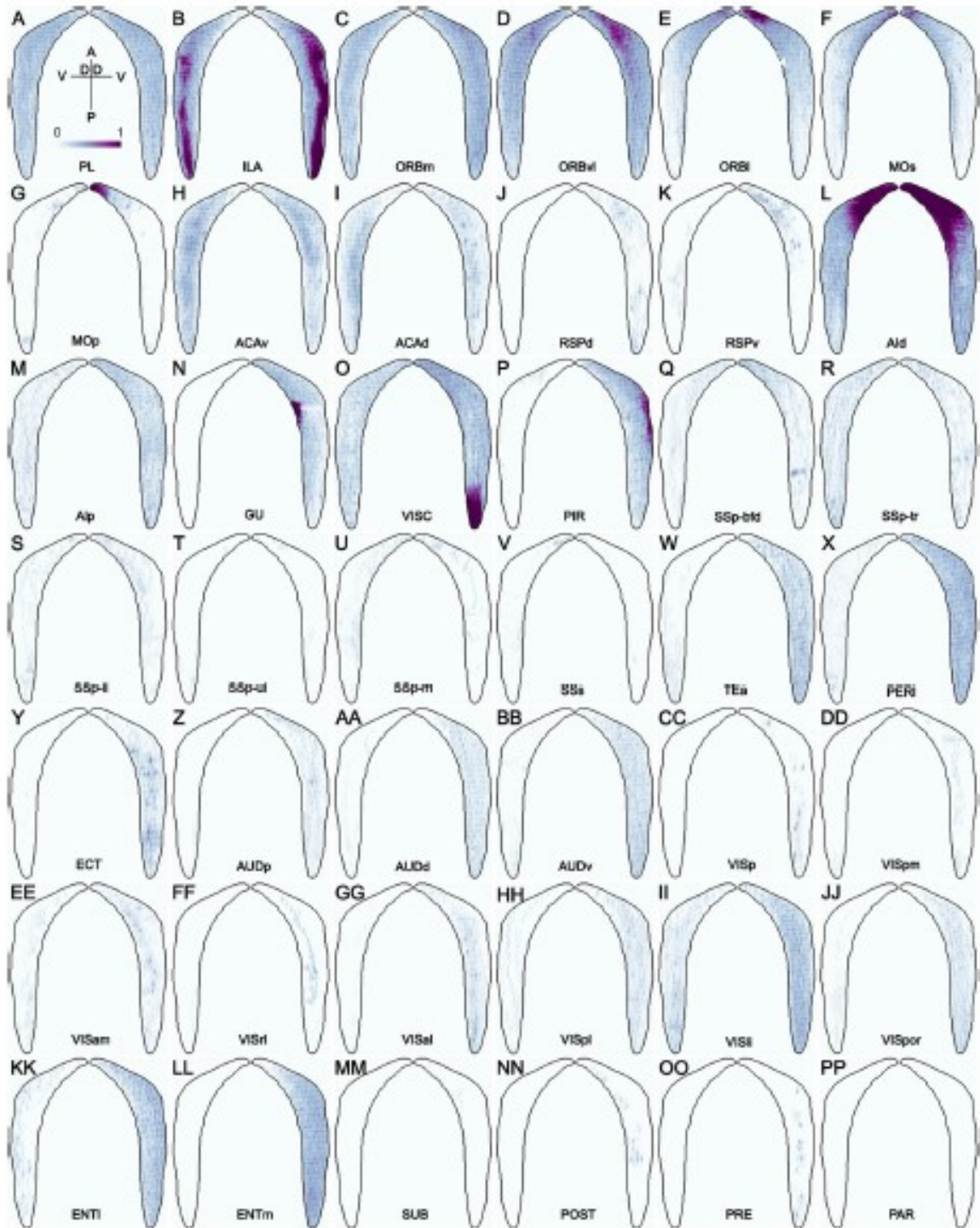


Figure 10. Représentation schématique des projections de 42 aires corticales vers le claustrum de la souris. En mauve, on observe la densité de projection du cortex indiqué vers le claustrum ipsilatéral (droit) et controlatéral (gauche) (Wang *et al.*, 2017).

Finalement, il est important de se rappeler que les projections les plus fortes au claustrum de la souris sont les projections frontales et que les projections sensorielles, comme les visuelles, sont plus faibles. Les projections sont en générales bilatérales, mais le cortex visuel primaire projette ipsilatéralement seulement. Également, les projections sensorielles au claustrum de la souris sont séparées longitudinalement dans un axe dorso-ventral. De plus, il y a des différences significatives des projections entre les espèces.

1.2.4.3 Connectivité claustro-corticale

La connectivité entre le claustrum et le cortex a été examinée chez les humains, les singes, les chats, les rats et les souris (Druga, 2014). Les neurones du claustrum projettent à presque toutes les aires corticales (Narkiewicz, 1964; Norita, 1977; Pearson *et al.*, 1982; Minciocchi *et al.*, 1985; Sloniewski *et al.*, 1986; Morys *et al.*, 1993; Reser *et al.*, 2014; Kitanishi & Matsuo, 2017). Des études tractographiques chez les humains ont d'ailleurs démontré des projections claustrales aux régions corticales suivantes : frontal supérieur, précentral, postcentral, orbitofrontal, préfrontal, temporal et occipital (Fernández-Miranda *et al.*, 2008).

C'est également le cas chez la souris; la connectivité entre le cortex et le claustrum étant réciproque, le claustrum reprojette à pratiquement toutes les aires corticales également, incluant des projections fortes aux cortex frontaux, insulaires, cingulaires, ainsi que des projections plus faibles aux cortex sensoriels (Wang *et al.*, 2017). La connectivité claustro-corticale de la souris est organisée topographiquement le long des axes médio-latéral et dorso-ventral du claustrum. Les projections semblent venir de neurones sur toute la longueur du claustrum (Zingg *et al.*, 2018). Les projections vers le cortex sont majoritairement ipsilatérales (Zingg *et al.*, 2018), bien que certains cortex reçoivent des projections controlatérales, beaucoup plus dispersées qu'ipsilatéralement. Le claustrum ne projette pas au claustrum controlatéral (Wang *et al.*, 2017).

La figure 11 ci-dessous représente la grande connectivité cortico-claustrale et claustro-corticales de la souris en résumé. Les projections ipsilatérales (A) et les projections controlatérales (B) du claustrum et du cortex cérébral chez la souris sont schématisées. Cette figure montre également la grande diversité de connectivité du claustrum avec la majorité des aires corticales.

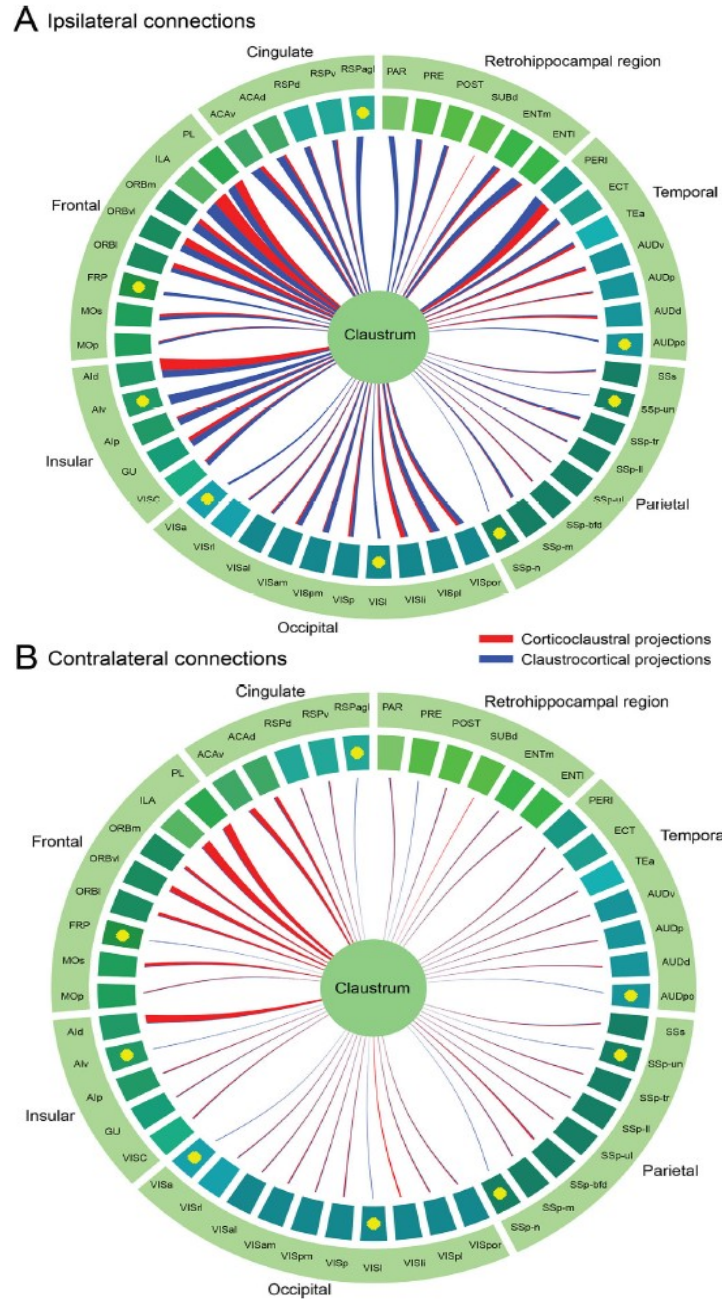


Figure 11. Représentation schématique des projections ipsilatérales (A) et contralatérales (B) du claustrum et du cortex cérébral chez la souris. Les lignes en rouge sont les projections cortico-claustrales alors que les lignes bleues représentent les projections claustrum-corticales. L'épaisseur des lignes représente l'intensité des projections; on remarque donc que les projections ipsilatérales sont plus fortes que les projections contralatérales, et la grande réciprocity de projections entre les aires corticales et le claustrum (autant ou presque de lignes rouges que bleues). Les points jaunes marquent les cortex où il n'y a pas d'injection ou qu'elle n'est pas significative (Wang *et al.*, 2017).

1.2.4.4 Connectivité avec les structures subcorticales

Les inputs subcorticaux au claustrum sont difficiles à étudier, étant donné qu'il s'agit de structures profondes et donc ces injections de traceurs sont encore plus rares (Qadir & Mathur, 2019). On sait maintenant cependant que le claustrum entretient des projections réciproques avec le putamen (Borra *et al.*, 2020), le globus pallidus et l'amygdale latérale (Park *et al.*, 2012). Il reçoit également des projections de plusieurs centres thalamiques et hypothalamiques, qui sont aussi réciproques (Zingg *et al.*, 2018). Ces projections semblent unilatérales (Mathur *et al.*, 2009), sauf pour l'amygdale, qui est bilatérale, suggérant un rôle du claustrum dans le système limbique, une fonction qui sera abordée dans la section 1.3 suivante (Majak *et al.*, 2002; Atlan *et al.*, 2018; Zingg *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2019; Jackson *et al.*, 2020).

Une étude récente de Wang et al (2018) indique de nombreuses connexions de structures subcorticales vers le claustrum. En effet, le striatum, le pallidum, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale, le pont, et le cervelet projettent avec différentes forces vers le claustrum. Les projections les plus fortes proviennent de l'amygdale latérale, le noyau piriforme dorsal, le noyau reuniens, le noyau paraventriculaire, le noyau olfactif antérieur et les noyaux médio-dorsal et antéro-médial. D'autres projections sont plus modérées, provenant du noyau du tractus olfactif latéral, de l'aire piriforme-amygdalaire, de l'amygdale postérieure, du noyau central médial et du noyau parataenia. Le noyau tegmental ventral, le noyau raphe dorsal et les projections du cervelet sont plutôt faibles. Les projections sont majoritairement (60%) ipsilatérales alors que d'autres sont bilatérales (40%), avec les projections ipsilatérales plus fortes que les contralatérales (Wang, 2018).

1.3 Fonctions

Le claustrum a longtemps été incompris, surtout au niveau fonctionnel. Cependant, à la suite de la suggestion de Crick et Koch (2005) que le claustrum puisse être impliqué dans la conscience, les études sur les fonctions du claustrum ont pris un nouvel essor. Maintenant, on sait que les fonctions du claustrum sont en lien avec la connectivité réciproque avec la majorité des aires corticales, ainsi que sa connectivité interne longitudinale. En effet, le claustrum serait impliqué dans l'amplification d'oscillations corticales et leur synchronisation en plus du maintien de l'attention. Des hypothèses stipulent également un rôle dans l'intégration multimodale, la conscience, ainsi que dans certains processus cognitifs, qui ont été émis justement grâce à l'article de Crick and Koch (2005), mais qui font encore l'objet de discussions.

1.3.1 Amplification et synchronisation corticale

Le claustrum jouerait un rôle dans la synchronisation des oscillations du cortex. Dans le cortex, les réseaux d'interneurones GABAergiques PV+ agissent dans la synchronisation de l'activité des neurones de projection corticaux et dans la genèse de rythmes corticaux, dont ceux dans la bande passante gamma (30-80Hz) (Galarreta & Hestrin, 2001; Bartos *et al.*, 2007; Cardin *et al.*, 2009; Sohal *et al.*, 2009). Les circuits internes du claustrum pourraient jouer un rôle similaire en réponse à des afférences corticales. La modulation des réseaux GABAergiques PV+ du claustrum pourrait altérer les propriétés de ces réseaux locaux, qui peuvent synchroniser ou désynchroniser l'activité des neurones de projections claustru-corticaux, ce qui influencerait la coordination des activités de différentes régions corticales (Bartos *et al.*, 2007; Connors *et al.*, 2010; Smythies *et al.*, 2012; Baizer *et al.*, 2014; Goll *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2017; Jackson *et al.*, 2018).

Un principe commun reconnu dans le cerveau des mammifères est l'existence d'oscillations périodiques entre des groupes de cellules actives pour diriger la perception, la cognition et le comportement (Engel *et al.*, 1991; Buzsáki *et al.*, 2013; Buzsáki & Schomburg, 2015; Vidyasagar & Levichkina, 2019). Le claustrum peut être activé quand un processus implique plus d'une aire corticale. Lorsque deux aires corticales communiquent ensemble, elles émettent des connexions cortico-corticales synchronisées à des fréquences gamma pour s'échanger les informations nécessaires. Les circuits internes du claustrum (cellules ClaC)

reçoivent des projections corticales, détectent ces oscillations gamma corticales et se synchronisent à ces fréquences (fig. 12). Cela permet ensuite de reprojeter aux différents cortex pour augmenter l'oscillation entre les deux régions (Smythies *et al.*, 2012). Les ondes synchronisées de chacune des aires corticales sont traitées par de fortes synchronisations intraclaustrales pour les augmenter. Nous pouvons appeler ce phénomène « liaison cognitive » (Smythies, 2014).

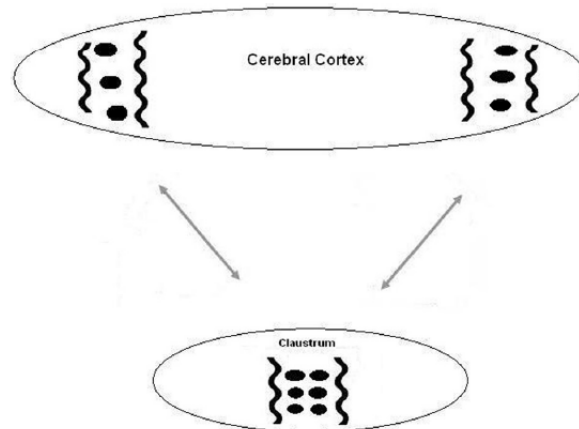


Figure 12. Diagramme des relations d'oscillations entre le cortex et le claustrum. Les oscillations entre deux aires corticales sont synchronisées entre elles par des projections cortico-corticales. Cette synchronisation est augmentée et développée par des connexions intraclaustrales (Smythies *et al.*, 2012).

Le claustrum joue également un rôle dans l'arrêt des oscillations corticales par une inhibition feedback du claustrum au cortex (Atlan *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2018; White *et al.*, 2018; Vidyasagar & Levichkina, 2019). Une étude récente montre que la fin d'une tâche corticale coïncide avec l'inhibition des neurones GABAergiques du claustrum qui projettent au cortex (Vidyasagar & Levichkina, 2019). Cette inhibition GABAergique pourrait être causée par l'activation de récepteurs kappa opioïdes (Hjelmstad *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013), très abondants dans le claustrum (Mansour *et al.*, 1994b). Les mécanismes d'activation de ces récepteurs kappa opioïdes qui engendrent l'inhibition du relâchement de GABA sont cependant encore peu connus. Cette inhibition interromprait la génération d'oscillations claustru-corticales (par le manque de GABA pour activer les neurones GABAergiques du claustrum) et mettrait fin à la synchronisation corticale (Vidyasagar & Levichkina, 2019).

La connectivité interne du claustrum décrite dans la section 1.2.4 permet également de faire un lien entre le claustrum et l'inhibition corticale, grâce à l'activation des interneurons

inhibiteurs PV+, qui inhibent les cellules ClaC glutamatergiques excitatrices du cortex, ce qui diminue également l'activité corticale par une connectivité feedback (Kim *et al.*, 2016). Les neurones du claustrum jouent un rôle crucial dans la synchronisation d'interneurones inhibiteurs sur de grandes surfaces corticales. En effet, la stimulation optogénétique des neurones glutamatergiques excitateurs du claustrum active les interneurones inhibiteurs du cortex et supprime la synchronisation des neurones corticaux (Jackson *et al.*, 2018; Narikiyo *et al.*, 2020). Le claustrum jouerait donc également un rôle dans l'inhibition du cortex.

1.3.2 Attention

Les connexions les plus proéminentes du claustrum sont avec les cortex frontaux, qui sont impliqués dans l'attention dirigée par une tâche planifiée (fig. 13a) (Goll *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2017; White & Mathur, 2018). En effet, comme mentionné dans la section 1.3.1, le claustrum aide à amplifier le synchronisme entre les aires corticales. Il permet donc une séquence d'activation des aires corticales nécessaires dans la modulation de l'attention dans une scène et est aussi impliqué dans l'arrêt des activités corticales. En effet, les projections des aires sensorielles assurent une modulation de l'attention en fonction de la saillance des stimuli dans une scène visuelle par exemple. Le claustrum contrôle le gain des réponses sensorielles (fig. 13e) par la modulation des oscillations corticales (et son rôle dans l'arrêt des activités corticales) afin de réduire les inputs sensoriels compétiteurs, permettant de focaliser l'attention sur l'objet important (fig. 13d) (Goll *et al.*, 2015).

Les projections motrices, principalement issues du cortex moteur secondaire (Wang *et al.*, 2017) ainsi que les projections sous-corticales (fig. 13b) des centres neuromodulateurs au claustrum influencent également l'attention. En effet, les projections des aires motrices permettent d'enclencher un signal important dans les différentes modalités sensorielles, et donc, « l'activation des sens ». Les projections du claustrum aux centres moteurs et oculomoteurs permettraient de promouvoir des réponses motrices importantes pour attirer l'attention sur un objet en dirigeant l'orientation des yeux et/ou du corps. Les projections subcorticales de centres neuromodulateurs (raphe dorsal), de contexte (hippocampe et cortex entorhinal) et d'émotion (amygdale) modulent l'attention dépendant de l'état (fig. 13c) (Goll *et al.*, 2015).

Étant donné le faible niveau d'activité basale des cellules du claustrum qui répondent transitoirement aux stimuli présentés soudainement, le claustrum pourrait être un détecteur de saillance pour la communication cortico-corticale (Remedios *et al.*, 2010). Le claustrum projette vers le cortex cingulaire antérieur ipsilatéral principalement (Smith & Alloway, 2010), une aire impliquée dans le processus attentionnel. Le cortex cingulaire antérieur est capable de détecter des stimuli insignifiants dans une tâche comme une recherche visuelle et de les exclure. Il permet donc de diriger l'attention sur les stimuli importants, en supprimant ceux qui ne le sont pas (Muir, 1996; Botvinick, 2007; Carter & van Veen, 2007). Grâce à cette connexion avec le cortex cingulaire antérieur, le claustrum peut faire partie d'une boucle cortex-claustrum-cingulaire qui permet de mesurer la saillance des stimuli entrants, permettant l'association des stimuli sensoriels importants ou non. En plus de la détection des tâches importantes et du processus d'attention, une étude récente a démontré un rôle du claustrum dans la résilience aux distractions, grâce au support de la performance lors d'une tâche en présence d'un distracteur (Atlan *et al.*, 2018).

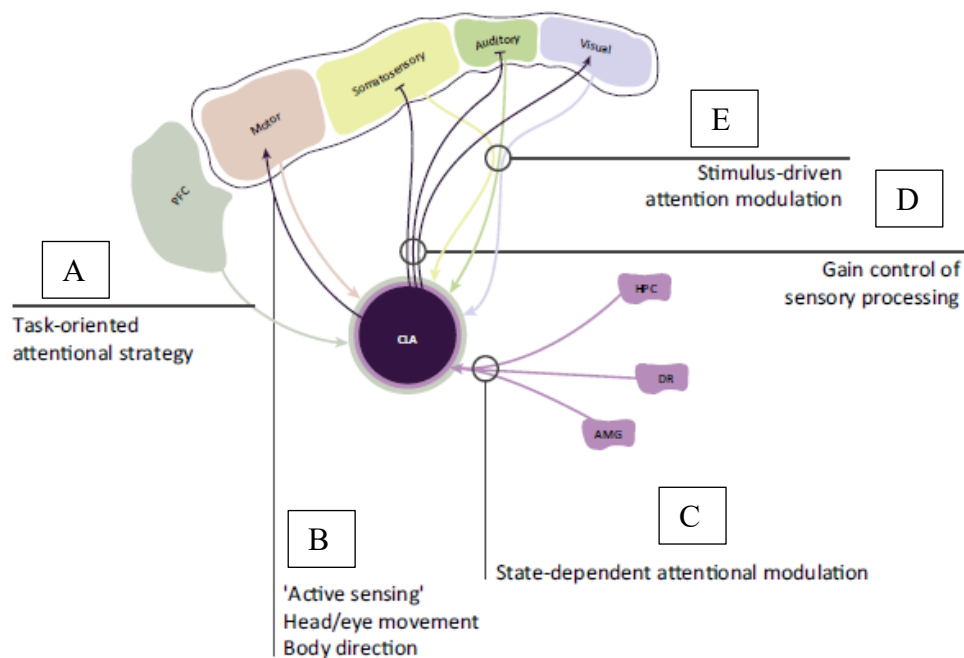


Figure 13. Représentation schématique du rôle des connexions cortico-claustrales des cortex préfrontaux, moteurs, somatosensoriels, et sensoriels dans l'attention (Goll *et al.*, 2015).

Le claustrum est impliqué dans des fonctions limbiques comme l'attention, mais également dans les émotions et la mémoire (Jackson *et al.*, 2020). Il établit des connexions bidirectionnelles avec les cortex frontaux, mais également les cortex limbiques, temporaux, et somatosensoriels. En effet, le claustrum ventral reçoit des connexions avec les aires limbiques comme le gyrus cingulaire antérieur, l'amygdale, l'hippocampe et autres qui assurent une coordination des émotions (Pathak, 2014). Puisque le claustrum serait impliqué dans la synchronisation des aires corticales, en plus d'être un intégrateur sensoriel, il pourrait aussi être impliqué dans l'intégration des opérations émotionnelles, sensorielles et motrices. Il est aussi impliqué dans la mémoire contextuelle et la peur, par ses connexions avec le cortex entorhinal (Kitanishi & Matsuo, 2017). Le claustrum peut également travailler en tandem avec ce noyau et le septum médial dans la modulation des rythmes theta de l'hippocampe (Kirk *et al.*, 1996; Varga *et al.*, 2008), ce qui établit un lien avec la performance dans des tâches de mémoire (Jones & Wilson, 2005; Qadir & Mathur, 2019).

1.3.3 Conscience

Une des hypothèses fonctionnelles qui a beaucoup attiré l'attention à la suite de l'article de Crick et Koch (2005), est celle que le claustrum jouerait un rôle dans la conscience. Il jouerait tout d'abord un rôle dans la conscience expérience, c'est-à-dire la conscience du monde extérieur. Grâce à sa connectivité réciproque avec la majorité des aires corticales, il a été proposé que le claustrum jouerait un rôle d'intégration multisensorielle (Crick & Koch, 2005) qui permettrait de lier les informations des différents cortex sensoriels pour former une perception consciente des objets et du monde extérieur (Naghavi *et al.*, 2007). Le cerveau aurait donc un intégrateur central permettant d'unifier les sens en un signal cognitif cohésif. Des objets ou des événements comprennent plusieurs attributs, comme la couleur, la forme, la distance, l'odeur, le son, la vitesse, etc. Cette hypothèse fonctionnelle est cependant fondée sur une seule étude d'intégration sensorielle qui stipule qu'en absence des deux claustra, ces attributs ne peuvent pas être compris de manière intégrée et le sujet ne peut pas percevoir les objets ou les événements; ils sont conscients de ces événements séparément, et non comme un tout (Crick & Koch, 2005).

Le claustrum jouerait également un rôle dans la conscience vigilance, c'est-à-dire la conscience qui implique l'évanouissement et le sommeil. En effet, plusieurs études démontrent une implication du claustrum dans la perte de conscience, le coma ou l'absence de réponse à certains stimuli. Premièrement, le claustrum a été stimulé chez une patiente de 54 ans et la conscience a été interrompue. Il y avait alors un arrêt complet de comportement volontaire, une absence de réponse et une amnésie. Lorsque la stimulation s'est arrêtée, la patiente a repris conscience (Koubeissi *et al.*, 2014). Deuxièmement, une étude de Grafman et al (2015) montre une perte de conscience chez des anciens combattants avec des lésions du claustrum. Les patients avec des lésions au claustrum étaient 4,48 fois plus à risque d'avoir des pertes de conscience, et 5,57 fois plus de chance qu'elles soient prolongées (Chau *et al.*, 2015). Troisièmement, la connectivité fonctionnelle du claustrum est perturbée par l'anesthésie, ce qui suggère que le claustrum est impliqué lorsqu'un sujet est conscient (Smith *et al.*, 2019; Jackson *et al.*, 2020). Quatrièmement, des expériences montrent des pertes de sensation du corps ou de la conscience de l'environnement externe chez des sujets lorsqu'ils sont sous l'influence de la plante psychoactive *Salvia divinorum* qui contient la salvinorin A, un agoniste k-opioid, ce qui est en accord avec la forte présence de récepteurs salvinorin A dans le claustrum (Stiefel *et al.*, 2014; Chau *et al.*, 2015). Cinquièmement, le claustrum est connecté avec un réseau susceptible de causer des pertes de conscience, par le biais des connexions du tronc cérébral (Crick & Koch, 2005; Koubeissi *et al.*, 2014; Chau *et al.*, 2015).

1.3.4 Autres fonctions

En plus des fonctions du claustrum dans la synchronisation et l'amplification corticale, l'attention, les émotions, l'intégration sensori-motrice et la conscience décrites plus haut (Jackson *et al.*, 2020), le claustrum est une interface entre les systèmes moteurs et limbiques. La littérature abonde dans des descriptions de l'implication du claustrum dans des fonctions très variées comme des fonctions exécutives et cognitives, le sommeil, le système de récompense à la drogue, l'impulsivité, la sexualité et dans la régulation cardiovasculaire lors d'exercice intense. Il jouerait aussi un rôle dans certaines pathologies.

1.3.4.1 Fonctions exécutives et cognitives supérieures (cortex frontaux)

Des études récentes ont montré l'importance des projections claustrо-corticales dans les fonctions cognitives (Smith & Alloway, 2010; Brown *et al.*, 2017; Jackson *et al.*, 2018; White *et al.*, 2018). Le claustrum pourrait supporter des processus cognitifs en coordonnant plusieurs régions corticales dont le cortex cingulaire antérieur, préfrontal et pariétal (Krimmel *et al.*, 2019) qui sont associées au contrôle cognitif. Par exemple, le cortex cingulaire antérieur achemine vers le claustrum un signal proportionnel à la charge cognitive (White & Mathur, 2018). Le claustrum est activé au début d'une tâche cognitive complexe; il jouerait donc un rôle dans le changement d'une tâche compliquée à l'autre plutôt que dans le maintien de la performance lors d'une tâche (Krimmel *et al.*, 2019; White *et al.*, 2020). L'inhibition du claustrum entraîne également une réduction de la prise de décision dans les tâches exigeantes (White *et al.*, 2020). Le claustrum joue donc un rôle important dans la performance dans l'exécution de tâches complexes grâce à ses importantes connexions avec les cortex associés au contrôle cognitif, plus particulièrement le cortex cingulaire antérieur (Smith & Alloway, 2010; White *et al.*, 2018; Krimmel *et al.*, 2019; White *et al.*, 2020).

Une étude récente montre que le claustrum est également en mesure d'inhiber le cortex préfrontal de façon importante et soutenue. Cette inhibition claustrо-corticale disynaptique est engendrée par les interneurons qui contiennent le neuropeptide Y, et par certains interneurons PV+, qui inhibent les cellules du claustrum qui ont une projection vers le cortex (Kim *et al.*, 2016). Même si plusieurs structures entraînent l'inhibition du cortex préfrontal, l'efficacité des projections claustrо-corticales pour la suppression de l'activité corticale semble être plus forte que les autres afférences (Gabbott *et al.*, 2006; Floresco & Tse, 2007; Cruikshank *et al.*, 2012; Dilgen *et al.*, 2013; Delevich *et al.*, 2015; McGarry & Carter, 2016). Cette organisation unique permet au claustrum de supprimer rapidement et avec force les cortex frontaux et suggère un rôle du claustrum dans la régulation de processus cognitif de ces cortex (Jackson *et al.*, 2018).

1.3.4.2 Le sommeil

Le claustrum serait aussi impliqué dans le sommeil par sa connectivité avec le noyau supramammillaire (Qadir & Mathur, 2019). Une étude récente sur le reptile indique d'ailleurs que le claustrum joue un rôle dans la formation des oscillations de basse fréquence dans le

sommeil, pour moduler l'état du télencéphale (Norimoto *et al.*, 2020). Une étude sur le chat décrit aussi l'endormissement lors de la stimulation du claustrum (Gabor & Peele, 1964). Une étude plus récente sur les rongeurs indique également que le claustrum est actif durant le sommeil (Renouard *et al.*, 2015). Le claustrum serait également impliqué dans le maintien de l'état d'éveil grâce à de fortes connexions interhémisphériques avec le thalamus médio-dorsal et le cortex préfrontal médial (Kurada *et al.*, 2019).

1.3.4.3 Système de la récompense et impulsivité

Des études récentes suggèrent que le claustrum est impliqué dans une boucle de connectivité qui influence l'impulsivité et le système de récompense, comme dans l'addiction, grâce à ses connexions avec le cortex préfrontal. En effet, Liu et al (2019) montrent que l'activation et l'inhibition chimio génétique des connexions entre le claustrum et le cortex préfrontal augmente et réduit, respectivement, les comportements impulsifs. Dans cette étude, des souris sont soumises à la consommation de méthamphétamine; l'activation du claustrum par une stimulation induite engendre des réponses prématurées dans la prise de métamphétamine (METH), en plus d'augmenter ces réponses prématurées si la dose de METH augmente (Liu *et al.*, 2019). L'expression de récepteur à la dopamine dans le claustrum a été rapporté, en plus de réponses fonctionnelles à la dopamine (Cortimiglia *et al.*, 1982; Fuxe *et al.*, 1987; Weiner & Brann, 1989; Suzuki *et al.*, 1998; Mijnster *et al.*, 1999; Sitte *et al.*, 2017b; Khlghatyan *et al.*, 2019); cette innervation dopaminergique pourrait supporter le système de la récompense (Smythies *et al.*, 2012; Zingg *et al.*, 2018). De plus, une étude récente montre que les récepteurs à la dopamine du claustrum seraient activés par la cocaïne. Les neurones dopaminergiques du claustrum qui expriment les récepteurs à la dopamine D1 projettent par la suite au cortex frontal, impliqué dans le système de la récompense, de la motivation et de l'incitation à la drogue. De plus, ils ont découvert que l'inhibition de ces neurones du claustrum permet de diminuer l'incitation à la consommation de cocaïne (Terem *et al.*, 2020).

1.3.4.4 Pathologies

Le claustrum pourrait être impliqué dans l'autisme par son rôle dans plusieurs fonctions cognitives qui sont modifiées chez les sujets autistes, par exemple la peur (Dubroff & Newberg, 2008), la mémoire (Morys *et al.*, 1996), l'apprentissage (Chachich & Powell, 2004), la

récompense/addiction (Morys *et al.*, 1996; Naqvi & Bechara, 2010), les comportements émotionnels (Bennett & Baird, 2006), la psychose (Sperner *et al.*, 1996), etc. L'immaturation du claustrum, ainsi que la déficience fonctionnelle de ses neurones pourraient être responsables des déficits d'adaptabilité et de conscience chez les personnes autistes; le volume du claustrum est plus petit que la normale chez ces patients (22%) (Corcoran, 2014).

Le claustrum pourrait être impliqué dans la schizophrénie. Des anomalies dans les oscillations gamma des interneurons du claustrum sont impliquées dans les symptômes positifs de la schizophrénie (Bruen *et al.*, 2008; Cascella *et al.*, 2011; Corcoran, 2014). Également, un homme avec des lésions bilatérales au claustrum a souffert d'hallucinations visuelles et auditives (Ishii *et al.*, 2011). De plus, il contient une grande quantité de récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂ (Baizer, 2001; Sitte *et al.*, 2017a; Jackson *et al.*, 2020), qui sont impliqués dans l'apparition d'hallucinations (Stiefel *et al.*, 2014). Le claustrum serait également impliqué dans les crises d'épilepsie; sa stimulation entraîne des convulsions (Mohapel *et al.*, 2001; Corcoran, 2014). Des lésions bilatérales du claustrum entraînent des convulsions épileptiques, une perte de vision, de l'audition et de la parole, qui peuvent se dégrader en problèmes psychiatriques (Sperner *et al.*, 1996).

Le claustrum est aussi affecté par la neurodégénérescence liée à la vieillesse et la maladie d'Alzheimer. Un dépôt de plaques amygdaloïdes et une perte de neurones ont été observés dans le claustrum de chiens vieillissants (Morys *et al.*, 1994) et des humains (Ogomori *et al.*, 1989) atteints de la maladie d'Alzheimer. En plus, si le claustrum est impliqué dans l'intégration sensorielle et dans la mémoire et qu'il est affecté dans la maladie d'Alzheimer, il pourrait alors faire partie du déficit fonctionnel associé à la perte de mémoire spatiale (Didic *et al.*, 2011). Des études de neuroimagerie fonctionnelle chez des personnes âgées saines et atteintes d'Alzheimer ont souligné que le claustrum est impliqué dans la récupération de la mémoire épisodique (Schwindt & Black, 2009). Il y a aussi une pathologie amyloïde dans le claustrum des patients atteints de Parkinson (Braak *et al.*, 2001; Braak *et al.*, 2007; Kalaitzakis *et al.*, 2009), ce qui entraîne les symptômes associés à la démence.

1.3.4.5 Régulation cardiovasculaire lors d'exercice intense

Comme mentionné précédemment, le claustrum joue un rôle dans l'éveil (Arnold *et al.*, 2002) et l'attention (Crick & Koch, 2005; Goll *et al.*, 2015), des fonctions importantes dans le contrôle de l'exercice de forte intensité (Kim *et al.*, 2020), en plus de la régulation autonome cardiovasculaire (Hatam *et al.*, 2013). En effet, l'amygdale et le claustrum ont une expression forte de c-fos lors d'activité physique intense. Également, la stimulation chimique et électrique du claustrum entraîne une diminution de la pression artérielle (Kim *et al.*, 2020). On pense également que le claustrum aurait une influence dans la régulation des centres autonomes, comme pour le comportement de fuite lors d'une urgence, en plus d'être connecté à l'amygdale qui contrôle aussi cette fonction (Aston-Jones & Cohen, 2005; Bhuiyan *et al.*, 2011; Burgess & Peever, 2013; Takagishi *et al.*, 2014; Yamanaka *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2020).

1.3.4.5 Sexualité

Comme expliqué précédemment, le claustrum est impliqué dans les processus motivationnels, l'émotion, l'impulsivité et les mécanismes de récompense. Puisque ces fonctions sont également impliquées dans le comportement sexuel, chez l'humain, le claustrum pourrait jouer un rôle dans les processus motivationnels de la sexualité (Rauch *et al.*, 1999; Bocher *et al.*, 2001; Qurrat ul & Abidi, 2005). De plus, l'activation bilatérale du claustrum est impliquée dans l'augmentation du flux sanguin dans l'érection des hommes lors de la présentation d'un stimulus visuel excitant (Stoléru *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2002).

En bref, ce qui est important à savoir sur les fonctions du claustrum, c'est que ceux-ci sont en général que des hypothèses. Celles-ci sont émises en raison de la forte connectivité réciproque entre le claustrum et le cortex, ce qui lui permettrait de jouer un rôle dans une multitude de fonctions limbiques, cognitives et exécutives. Les hypothèses fonctionnelles les plus importantes concernent celles sur la synchronisation et l'amplification d'oscillations corticales et l'attention, alors que l'hypothèse fonctionnelle sur l'intégration sensorielle et la conscience n'est qu'encore spéculative, en raison d'études contradictoires.

1.4 Objectifs de l'étude

1.4.1 Axones uniques

La connaissance de la circuiterie du cerveau est essentielle à la compréhension de ses fonctions (Crick & Koch, 2005; Sporns *et al.*, 2005). Le but des neurosciences modernes est de cartographier les circuits neuronaux du cerveau complet, puisque la connectivité de longue portée permet de comprendre comment l'information voyage entre les différentes régions cérébrales (Bohland *et al.*, 2009; Economo *et al.*, 2016). La connectivité entre les régions ou les structures du cerveau et comment l'information est distribuée à l'intérieur de ces structures, et par le fait même, des différents neurones, repose sur la structure des axones (Economo *et al.*, 2019). Les reconstructions axonales permettent également de définir et de différencier les types de neurones (Economo *et al.*, 2016; Economo *et al.*, 2019).

L'augmentation de l'efficacité et de l'exactitude des méthodes de marquage, de traçage, de stimulation et d'enregistrement de l'activité neuronale ont permis d'affirmer que la connectivité du cerveau est très spécifique, surtout à l'échelle d'axones uniques; les axones sont donc un morceau important de la microcircuiterie (Rockland, 2016a; b). De plus, ces méthodes de marquage, comme l'injection de traceurs, permettent de cartographier de multiples groupes neuronaux fonctionnellement et structurellement distincts, et de visualiser ou reconstruire des axones, ce qui représente une révolution de la recherche en connectivité et fonctionnalité du cerveau.

Il existe une plateforme d'axones reconstruits (MouseLight, Janelia Research Campus, 2018) dans tout le cerveau de la souris. Cependant, cette banque ne comprend pas de reconstructions d'axones du cortex visuel vers le claustrum; ces informations sont donc vraiment manquantes dans la littérature. De plus, la banque d'axone ne donne pas d'indice sur le diamètre axonal ni sur la potentielle carte synaptique; aucune information sur les varicosités. De ce fait, même la morphologie des quelques axones du cortex vers le claustrum qui sont répertoriés est moins révélatrice que celle des axones présentés dans ce mémoire, puisqu'ils illustrent la trajectoire et leur morphologie uniquement (Winnubst *et al.*, 2019). Les reconstructions tridimensionnelles du présent projet comportent des informations sur le diamètre axonal, la longueur axonale, le nombre de collatérales, la distribution spatiale des

varicosités et leur grosseur qui sont nécessaires à la compréhension de l'anatomie du claustrum et de sa connectivité. De plus, puisqu'aucun axone visuel au claustrum de la souris n'est disponible dans cette banque, la présente étude est vraiment une première à l'échelle d'axone unique de cortex sensoriels vers le claustrum de la souris qui est disponible dans la littérature.

1.4.2 Hypothèses de recherche

La reconstruction d'axone unique permettra de voir la trajectoire et l'emplacement de ceux-ci dans le claustrum. En se basant sur le fait que le claustrum est séparé en différentes modalités sensorielles dans l'axe dorso-ventral (Atlan *et al.*, 2017), les axones provenant du cortex visuel devraient se retrouver dans le milieu du claustrum. Cependant, il est difficile d'émettre une hypothèse concernant la longueur des axones en se basant sur cette étude. Les secteurs longitudinaux des projections sensorielles pourraient être formés par des axones très longs (bleu marin, fig. 14a) qui parcourent toute la longueur du claustrum, ou ils pourraient être produits par l'agencement de plusieurs petits axones (cyan, fig. 14a). C'est grâce à l'étude de Kim et al (2016) qui stipule que le claustrum contient des cellules qui communiquent entre elles, qu'il est possible de penser que les axones sont probablement très longs, permettant des probables synapses avec les cellules claustrales, permettant d'augmenter ainsi la connectivité interne longitudinale du claustrum (fig. 14b). Également, pour assurer une communication dans l'axe dorso-ventral et permettre le chevauchement des modalités sensorielles, les axones auraient des collatérales vers d'autres modalités (bleu marin fig. 14a et bleu, fig. 14b).

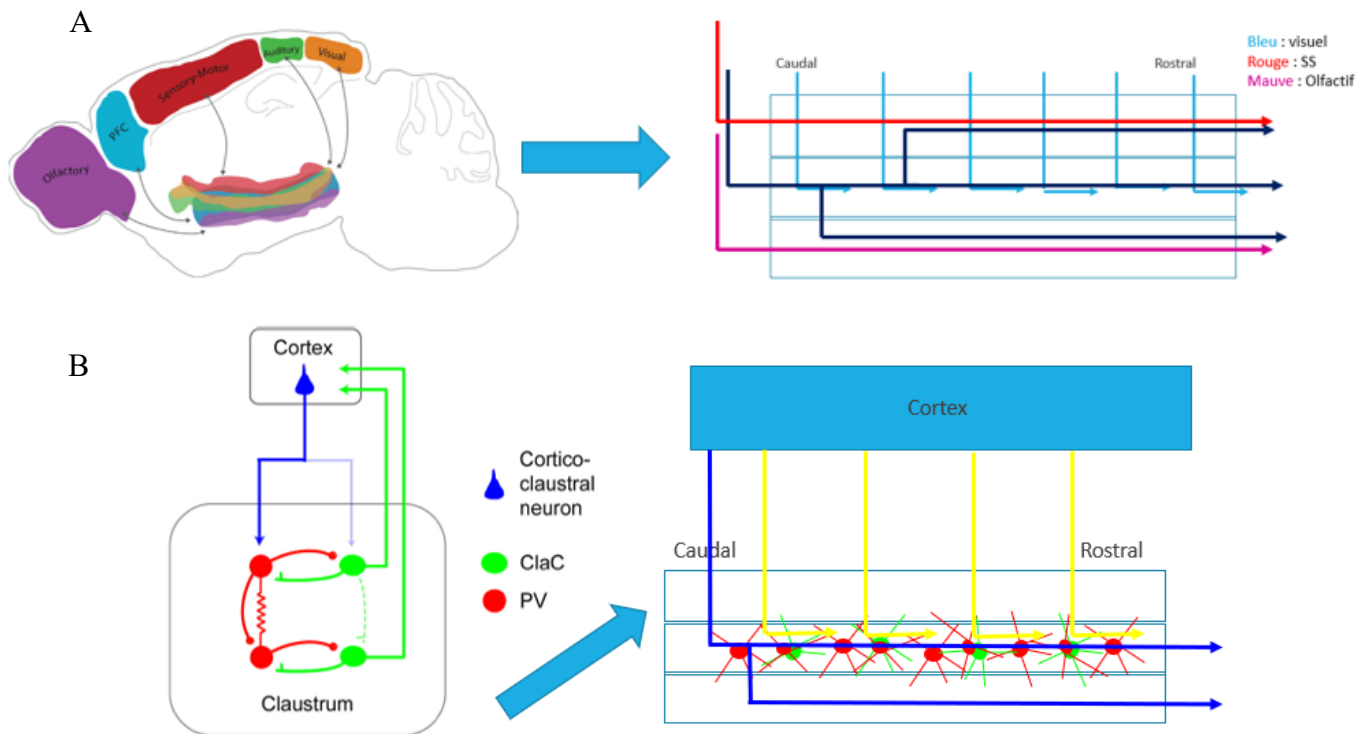


Figure 14. Schémas qui illustrent les hypothèses du présent projet, concernant le claustrum séparé en différentes modalités sensorielles selon un axe dorso-ventral, en se basant sur l'étude d'Atlan et al (A), ainsi que la connectivité interne en se basant sur l'étude de Kim et al (B). Dans les schémas, on voit les deux hypothèses concernant la trajectoire des axones, soit plusieurs petits axones (cyan (A) et jaune (B)) ou un seul axone très long (bleu marin) (Kim *et al.*, 2016; Atlan *et al.*, 2017).

Il reste également à savoir si les projections d'un même axone seront bilatérales ou ipsilatérales. Si les projections sont bilatérales, est-ce deux axones différents qui projettent aux deux claustra, ou s'agit-il plutôt d'une bifurcation interhémisphérique d'un même neurone ? Les projections du cortex visuel primaire sont essentiellement ipsilatérales. Cependant, les projections du cortex visuel secondaire sont bilatérales (Wang *et al.*, 2017). Il faut également se demander si la séparation dorso-ventrale en modalités sensorielles proposée par Atlan est la même dans le claustrum controlatéral; cette carte est décrite dans le claustrum ipsilatéral seulement, et doit donc être vérifiée dans le claustrum controlatéral. Puisqu'en général, la connectivité du claustrum est bilatérale, quoique moins forte controlatéralement, l'hypothèse de la présente étude est que les deux claustra peuvent être séparés de la même manière; le claustrum controlatéral aurait donc la même séparation dorso-ventrale.

Chapitre 2 : Méthodologie

2.1 Animaux

Les souris utilisées dans le présent projet de recherche sont des femelles C57BL/6J (fig. 15) adultes, âgées de 9 à 12 semaines. Ces souris sont les plus utilisées en laboratoire et sont celles qui ont le plus été utilisées génétiquement et pour des modèles de maladies humaines en recherche. Elles sont faciles à reproduire, sont robustes et ont beaucoup de souches disponibles (Engber, 2011).

Les souris sont maintenues à une température contrôlée entre 20 et 25°C avec lumières adaptatives phasées (12 à 14 heures de luminosité) et à 45 à 60% d'humidité. Elles sont maintenues en groupes de 2 à 6 souris dans des cages ventilées dont l'air est changé 10 à 20 fois par heure, dans un milieu enrichi (jouets, nid, cachette et éléments pour gruger). Elles sont nourries à volonté avec de la moulée pour rongeur #5075 (fournisseur Charles River) et avec de l'eau stérile. L'utilisation des animaux respecte les règles du Conseil Canadien de la protection des animaux et les manipulations ont été approuvées par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'UQTR.



Figure 15. Souris C57BL/6J (www.jax.org).

2.2 Aspects techniques de l'injection

2.2.1 *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine

La leucoagglutinine du haricot rouge *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), est une lectine utilisée comme traceur neuroanatomique antérograde (Gerfen & Sawchenko, 2016). Cette technique a été développée en 1983 par Gerfen et Sawchenko (Gerfen & Sawchenko, 1984). Le marquage au *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine permet de remplir les neurones du site d'injection dans leur intégralité, incluant leur corps cellulaire, leurs dendrites ainsi que leurs projections axonales. Le PHA-L se lie à un complexe oligosaccharide qui contient du galactose, du N-acetylglucosamine et du mannose, présent dans les neurones (Gerfen & Sawchenko, 2016). Le PHA-L est capté par les corps cellulaires des neurones du site d'injection et transporté antérogradement dans les axones. En effet, les axones sont très longs, mais n'ont pas la machinerie pour la biosynthèse de protéines nécessaires à leur survie; celles-ci sont synthétisées dans le corps cellulaire et transportées dans l'axone par des moteurs (kinésines) sur des rails (cytosquelette, microtubules), ce qui est appelé transport antérograde (fig. 16) (Roy *et al.*, 2005). Parfois, ce transport se fait très rapidement, s'il s'agit de protéines vésiculaires, alors qu'il peut aussi être lent, s'il s'agit de protéines cytosquelettiques, de neurofilaments ou de protéines cytosoliques (Roy *et al.*, 2005). Dans le cas du PHA-L, il s'agirait d'un transport antérograde assez lent, étant donné qu'il n'est pas intégré dans des vésicules par endocytose. Puisqu'il ne suit pas le chemin cellulaire des vésicules, il ne passe pas par le réticulum endoplasmique (RE). Cela fait en sorte que la protéine de PHA-L n'est pas modifiée dans la cellule par le RE, comme le seraient d'autres protéines, ce qui fait de lui un marqueur très stable (Gerfen & Sawchenko, 2016). Également, l'autre mécanisme de transport utilisé par certaines protéines de l'axone destinées à retourner vers le corps cellulaire suivront un transport rétrograde (Brown, 2003).

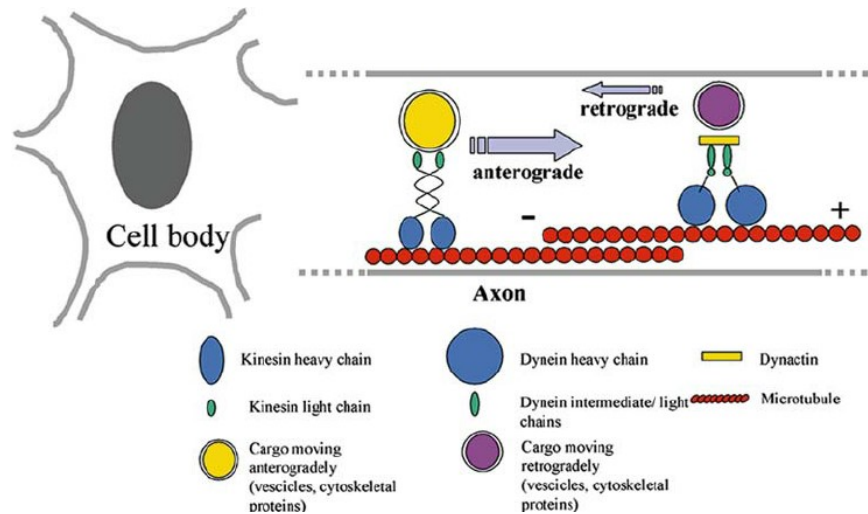


Figure 16. Représentation schématique des différentes sortes de transports axonaux, soit le transport rétrograde et le transport antérograde (Roy *et al.*, 2005).

Le PHA-L est un traceur très avantageux s'il est injecté par iontophorèse (section 2.2.2). C'est le mélange entre la technique d'injection par iontophorèse et le traceur en tant que tel qui fait que le PHA-L est une protéine de choix dans le traçage des axones. Premièrement, les sites d'injection par iontophorèse de PHA-L sont très petits, de l'ordre de 50 à 200 μm et sont très démarqués puisque les neurones sont complètement remplis. Deuxièmement, la morphologie fine des neurones est très bien observable, comme les corps cellulaires, les axones, les dendrites et même les boutons synaptiques des dendrites, étant donné qu'il est dans le cytoplasme neuronal plutôt que compartimentés dans des vésicules. Troisièmement, les neurones du site d'injection seulement sont marqués, ce qui permet de bien délimiter les neurones tracés des régions autour. Quatrièmement, même avec des injections très petites, la morphologie des axones marqués, des boutons terminaux, des petites collatérales et même des boutons en passant est très bien montrée. Cinquièmement, le marquage est vraiment précis, spécifiquement antérograde; presque aucun transport rétrograde indésirable sera retrouvé. Sixièmement, les traceurs antérogrades sont plus rares que les rétrogrades; ayant besoin d'un traceur antérograde, les choix sont limités. Septièmement, le PHA-L n'est pas capté ni transporté dans les fibres de passage, ce qui permet de s'assurer que les axones marqués proviennent effectivement du site d'injection. Huitièmement, il n'y a pas de dégradation de la leucoagglutinine ou de son transport lorsque l'on n'excède pas 17 jours de survie, ce qui permet de visualiser des axones très longs. Finalement, il peut être utilisé en même temps qu'un autre traceur neuronal étant donné qu'il

résiste à la peroxydase et qu'il est utilisé en immunofluorescence (Gerfen & Sawchenko, 2016). En bref, le PHA-L est transporté antérogradement pour marquer les axones et leurs terminaisons, avec peu de contamination d'axones passants et permet de marquer spécifiquement même les structures fines qui traversent de longues distances, sans dégradation, ce qui fait de lui une technique très avantageuse (Cucchiaro & Uhlrich, 1990).

2.2.2 Iontophorèse

L'iontophorèse est le relâchement de substances à partir de micropipettes par l'entremise de courant électrique (Curtis, 1964). Une pipette de verre remplie de traceur est insérée dans le cortex cérébral. Le principal mécanisme de transport est appelé « courant sortant ». Il s'agit de la migration des ions sous l'influence d'un champ électrique dans un seul sens (Krnjevic, 1963). La quantité d'ions relâchée q en mole s^{-1} suit l'équation suivante :

$$q = \frac{nI}{zF}$$

I est le courant en ampères, z la charge ionique, F la constante de Faraday ($96\,480\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) et n la fraction de courant transportée par l'ion, déterminé empiriquement entre 0.1 et 0.4. Cette équation permet de mesurer la quantité de charges éjectée.

Comme l'explique bien la figure 17, il y a des cations et des anions dans la solution à injecter, mais aussi dans la solution (ou tissu) dans lequel ce sera injecté. Par iontophorèse avec courant positif, les cations sortent de la pipette, et les cations présents dans le tissu sont repoussés davantage pour laisser place à l'injection. Les anions du tissu entrent dans la pipette, et ceux qui étaient dans la solution à injecter remontent. Ce sont donc les cations (charges positives) qui sont poussés dans le cerveau de l'animal lors de l'iontophorèse. L'inverse se produit si le courant appliqué est négatif (Purves, 1980).

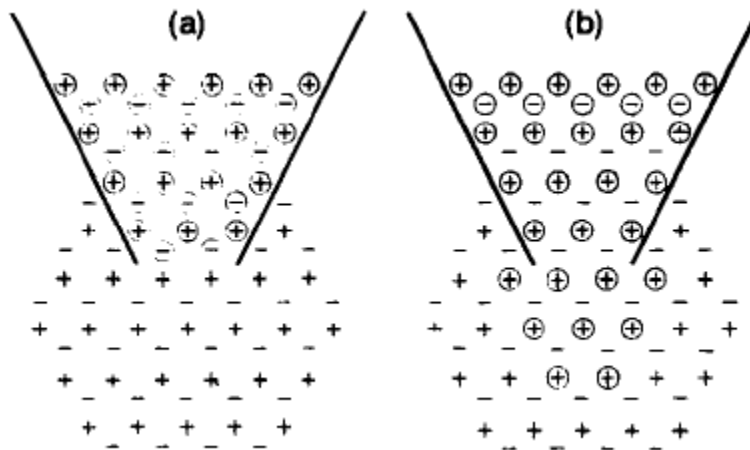


Figure 17. Schéma d'une pipette remplie d'un traceur ionisé (charges + et charges -). Représentation des charges avant le courant électrique (A). Mouvement des charges produit grâce au courant électrique (B). Les charges encadrées sont celles qui proviennent préalablement de l'état au repos en A, qui ont maintenant migré (Purves, 1980).

Le principe d'iontophorèse est facilité également par plusieurs mécanismes naturels externes au principe d'iontophorèse de base. La quantité d'ions injectés augmente légèrement, de manière presque négligeable, à cause de plusieurs mécanismes physiques. Premièrement, la diffusion permet que les ions ne coagulent pas dans l'embout de la pipette, ce qui permet une meilleure dispersion des ions dans le tissu. Deuxièmement, la gravité influence également le flux de l'injection en poussant naturellement sur le liquide à injecter. Troisièmement, l'électro-osmose est un phénomène qui influence l'injection par iontophorèse. Il s'agit d'un mouvement de l'eau de l'anode vers la cathode, c'est-à-dire un mouvement de la charge impliquée entre le verre et l'eau de la solution, qui va alors engendrer l'éjection des cations et diminuer l'éjection des anions qui n'est pas désirée (Kevin Li *et al.*, 2013). Ces trois mécanismes sont influencés par la grosseur de l'ouverture de la pipette, car plus l'embout est gros, plus il laissera passer de charges par diffusion (Purves, 1980). De ce fait, il est important de noter la grosseur de l'embout de la pipette (tableau 1) pour contrôler les mécanismes externes à l'iontophorèse. Les pipettes sont choisies de manière constante aux alentours de 20 μ m de diamètre; elles sont donc très petites pour diminuer les facteurs de diffusion naturelle. Le flux total de la solution au travers du tissu est donc l'équivalent du flux iontophorétique plus le flux de diffusion des procédés que l'on vient d'expliquer.

2.3 Chirurgie

Pour permettre l'injection du *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine (Vector Laboratories) (2,5% dans le tampon phosphate avec sel (PBS)) par iontophorèse, les souris sont préalablement préparées et induites avec 5% d'isoflurane sous oxygène; la suite des procédures est effectuée à 1% d'isoflurane. La première étape consiste au rasage de la tête et à l'injection sous-cutanée de buprénorphine (0,10 mg/kg, Vetergesic) (analgésique) ainsi que 0,5cc de solution saline (0,9%) stérile tiède. La tête est lavée avec trois répétitions de savon, alcool (70%) et iode pour désinfecter la peau. De plus, de l'onguent ophtalmique (Onguent ophtalmique de sulfates de néomycine et polymyxine B, et bacitracine, USP stérile (BNP, Vétuquinol)) est appliqué sur les yeux, permettant d'éviter la sécheresse oculaire. L'animal est alors déplacé sur un appareil de stéréotaxie et fixé à l'aide de barre d'oreilles (Ultra Precise just for Mouse Stereotaxic Instrument #catalogue 72-6155); c'est là que l'anesthésie est diminuée. La souris est placée sur un tapis chauffant à l'eau tout au long de la procédure pour réguler sa température corporelle; sa respiration est aussi surveillée. Une incision au niveau de la ligne médiane de la peau de la tête est effectuée avec un scalpel de calibre 22. Le crâne est fréquemment hydraté avec quelques gouttes de saline tiède. Ensuite, les positions des sutures bregma et lambda sont mesurées (fig. 18), afin de calculer les coordonnées du site d'injection visé. Il faut prendre ces deux mesures étant donné que l'atlas stéréotaxique de la souris donne les coordonnées pour la position du crâne lorsqu'il est droit (donc lorsque les deux fissures sont à la même hauteur).

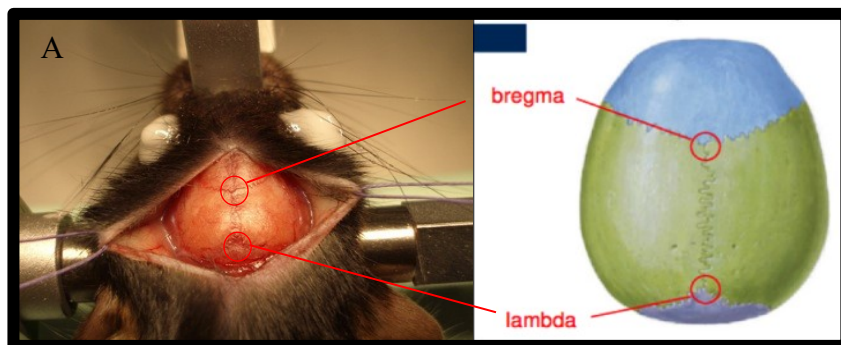


Figure 18. Incision du scalp et dévoilement du crâne et des sutures bregma et lambda qui servent de repères anatomiques importants (A - https://www.researchgate.net/figure/Exposed-mouse-skull_fig5_248396706 et B - www.studyblue.com).

Les coordonnées stéréotaxiques des différentes injections sont basées sur The Mouse Brain Atlas (Paxinos & Franklin, 2008) et elles sont fournies dans le tableau 1. Un léger fraisage du crâne à l'endroit précis des coordonnées d'injection est effectué (Complete Bone Micro-Drill System, #catalogue 72-4950, Ball Mill, Carbide #1 .031'' Dia), afin d'exposer la dure-mère et la surface du cortex cérébral. Une pipette de verre autour de 20µm de diamètre (voir tableau 1) remplie du traceur antérograde *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine (remplissage par capillarité ou avec une seringue Hamilton) a été insérée à différentes profondeurs, indiquées aussi dans le tableau 1. L'injection par iontophorèse peut alors débuter en imposant un courant de 2µA, 7 secondes on/off durant 15 minutes (source de courant Midgard) (fig.19-20). La pipette a alors été remontée de quelques microns (voir tableau 1) pour une deuxième injection de 15 minutes, au même endroit. Après l'injection, la pipette est retirée et le scalp est refermé par environ cinq points de suture au fil de Vicryl 6-0 (Ethicon). Pour éviter la douleur, 0,05cc (12,5 mg/kg) de carprofène (Rimadyl, Zoetis) (anti-inflammatoire) et 0,5cc de saline tiède sont injectés de manière sous-cutanée. La souris est alors retirée de l'appareil stéréotaxique pour se réveiller sous une lampe chauffante. Des injections de Rimadyl sont aussi effectuées vingt-quatre et quarante-huit heures à la suite de la chirurgie pour empêcher l'inflammation.

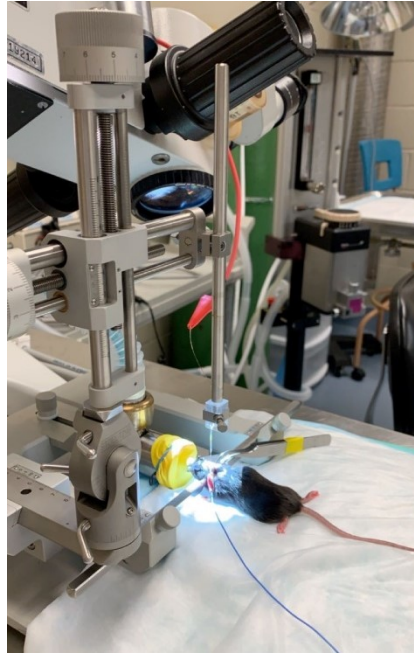


Figure 19. Injection par iontophorèse lors d'une chirurgie stéréotaxique.

Tableau I. Paramètres d'injections.

Souris	Coordonnées stéréotaxiques (Aire; ML; AP; DV)	Tip pipette (μm)	Paramètres d'iontophorèse	Temps d'injection (min)
AC4	V2M; -0,225; -0,35; 800 et 650	20	2 μA , 7 sec. on/off	2 x 15
AD3	V1; -0,225; -0,35; 900 et 750	23	2 μA , 7 sec. on/off	2 x 15
AD1	V1; -0,173; -0,3; 800 et 650	21	2 μA , 7 sec. on/off	2 x 15

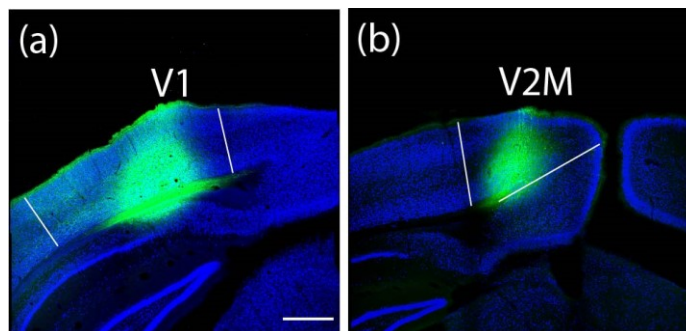


Figure 20. Sites d'injections dans les cortex visuels des spécimens. Photomicrographies de NeuN (bleu) et PHA-L (vert) qui représente les sites d'injection de *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine du spécimens AD3 (A) et du spécimen AC4 (B). Les lignes blanches délimitent les zones V2M (cortex visuel secondaire médial) pour AC4 (B) et la zone du cortex visuel primaire pour AD3 (A). Échelle = 500 μm .

2.4 Histologie

Après une semaine de survie, la souris est profondément anesthésiée et sacrifiée par perfusion transcardiaque avec environ 100 ml de tampon phosphate avec sel (PBS) 0,1M et 100 ml de paraformaldéhyde (PAF) 4%. La tête est coupée et le cerveau est récolté. Celui-ci est ensuite post-fixé durant une heure et demie dans la PAF 4%. Le cerveau est alors placé dans une solution de PBS + sucrose 30% durant environ vingt-quatre heures à 4°C (jusqu'à ce que le cerveau coule, il est alors saturé) pour la cryoprotection. La cryoprotection permet de diminuer la grosseur des cristaux de glace engendrés dans le tissu à la suite de la congélation. De ce fait, grâce à la cryoprotection, les cristaux de glace éventuellement formés sont très petits et cela n'engendre donc pas de dommages aux cellules, pour conserver les tissus du cerveau bien intacts (Akagi *et al.*, 2008). Ensuite, une incision est faite inférieurement dans l'hémisphère controlatéral à l'injection afin de permettre de se repérer en microscopie entre le côté ipsilatéral à l'injection et le côté controlatéral. Le cerveau est alors congelé dans de la glace sèche et sera conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

Le cerveau est coupé sur un microtome Leica (Model SM2400, #0601/06.2007) en coupes coronales à 80 µm. Les tranches sont disposées dans du PBS 0,1M afin d'effectuer le protocole d'immunofluorescence. Trois lavages dans le PBS 0,1M sont effectués et les coupes sont ensuite incubées dans du méthanol 50% pendant 20 min. à température de la pièce afin de perméabiliser les membranes. Les coupes sont rincées à nouveau trois fois dans le PBS 0,1M et elles sont placées dans une solution de blocage avec du serum normal d'âne (Normal Donkey Serum : NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories-017-000-121) (1%), du PBS 0,1M, de la glycine (0,1M) et du Triton X-100 (Sigma-1002889380) (2%) durant la nuit à 37°C. Par la suite, les coupes sont incubées soixante-douze heures dans la solution de blocage avec les anticorps primaires Goat anti-PHA-L (1 :1000), rabbit anti-MBP (myelin basic protein) (1 :1000) et guinea pig anti-NeuN (1 :6000) (tableau II) à 37°C. Trois rinçages sont effectués entre l'incubation des anticorps primaires et secondaires. Ensuite, les coupes sont incubées (37°C) dans les anticorps secondaires anti-goat alexa 488 (1 :500), anti-rabbit alexa 555 (1 :500) et anti-guinea pig alexa 647 (1 :500) (tableau II) pendant deux heures avec la solution de blocage. Trois derniers lavages au PBS 0,1M sont effectués, pour ensuite placer les coupes dans du tampon

phosphate (PB) 0,01M. Les coupes sont alors montées sur lames gélatinées (2%) avec un pinceau. Une attention particulière est portée pour monter les coupes dans l'ordre à laquelle elles ont été coupées, en plus de s'assurer que toutes les coupes sont présentes. Étant donné que les tranches sont disposées dans des puits à tour de rôle lors de la coupe, il est plus facile de connaître l'ordre et il est très facile de repérer s'il manque une coupe. Les lames sont ensuite déshydratées à l'alcool et au xylène (éthanol 70% 5 min., éthanol 95% 5 min., éthanol 100% 2 x 5 min., et xylène 2 x 5 min.) avant de coller les lamelles avec de l'Eukitt comme milieu de montage.

Tableau II. Tableau des anticorps

	Source, hôte	Concentration	Laboratoire	Code
Anticorps primaires				
Anti-PHA-L	Donkey, Goat	1 :1000	Vector laboratories	AS-2224
Anti-MBP	Donkey, Rabbit	1 :1000	Abcam	Ab40390
Anti-NeuN	Donkey, Guinea Pig	1 :6000	Millipore Sigma	ABN90
Anticorps secondaires				
Anti-Goat Alexa fluor 488	Donkey	1 :500	Jackson laboratories	AB_2336933
Anti-Rabbit Alexa fluor 555	Donkey	1 :500	Biolegend	406412
Anti-GuineaPig Alexa fluor 647	Donkey	1 :500	Jackson laboratories	706-605-148

2.5 Microscopie confocale

Les coupes coronales ont été analysées par microscopie confocale assistée par le logiciel Neurolucida (MBF Biosciences). Des images en microscopie à fluorescence ont été prises par un microscope confocal DSU spinning disk (Olympus BX51W1). Pour chaque coupe, une image à faible grossissement (10X) (UplanSApo 10X/0.40 ∞ /0.17/FN26,5 UIS2) révélant les corps cellulaires neuronaux (NeuN+, Alexa 647) a permis de délimiter le claustrum et de se repérer dans la coupe. Ensuite, une image révélant la myéline (MBP+, Alexa 555) à 10X a aussi permis de délimiter les contours du claustrum, et de voir la concentration de myéline dans celui-ci (fig. 21 et fig. 23a) (Wang *et al.*, 2017).

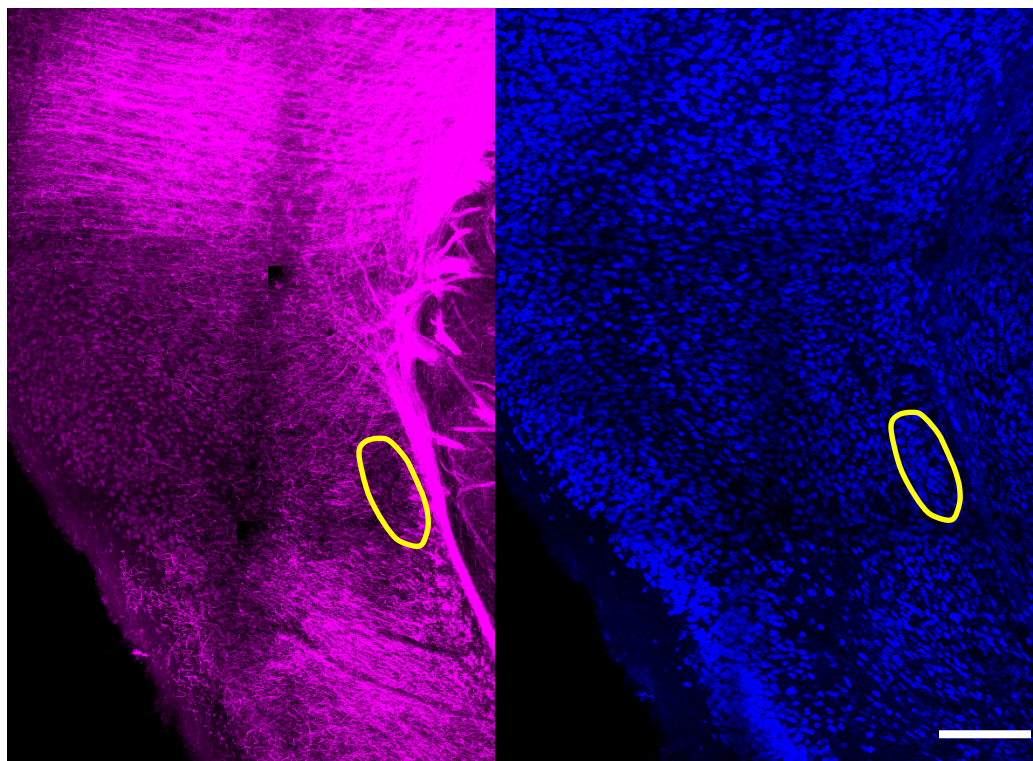


Figure 21. Photographies de myéline (MBP+, magenta) et des corps neuronaux (NeuN+, bleu) à 10X avec délimitations du claustrum en jaune. Échelle = 200 μ m.

Une image en contraste interférentiel (DIC optics) à 10X a aussi été prise pour certaines coupes, afin de délimiter les artéfacts et les vaisseaux sanguins, permettant alors de bien aligner les différentes coupes du cerveau, agissant comme repère spatial. Par la suite, les axones qui se situaient dans les régions délimitées comme étant le claustrum ont été photographiés à fort grossissement (100X) (UplanSApo 100X/1.40 Oil ∞ /0.17/FN26,5 UIS2) (fig. 22 et fig. 23b)

(PHA-L+, Alexa 488). L'acquisition des images d'axones a été effectuée en trois dimensions (15 μm d'épaisseur; 0,2 μm entre les images; 75 images/photos montages; de 2 à 10 plans/claustrium) ce qui permet d'observer la trajectoire et la morphologie tridimensionnelle des axones à travers toute l'épaisseur de la coupe dans l'axe Z (fig. 22).

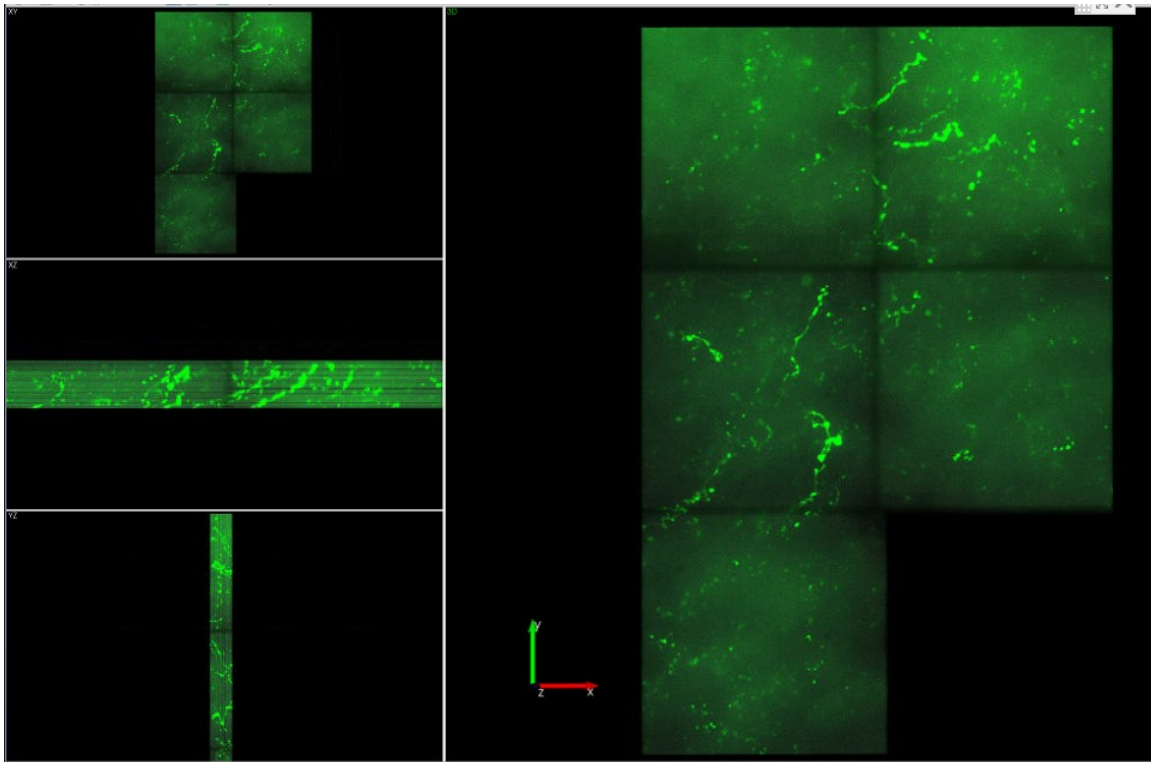


Figure 22. Représentation tridimensionnelle des photo-montages 3D acquis avec le microscope spinning disk DSU en Alexa 488. On observe les axones en vert (XY en haut à gauche, XZ au milieu à gauche et YZ au milieu en bas).

2.6 Analyse

Ces photomontages en trois dimensions ont permis la reconstruction d'axones grâce au logiciel NeuroLucida 360 (MBF Biosciences). Les axones ont été tracés grâce à un outil guidé du logiciel (Fonction «User-guided») (fig. 23b axones 1 et 2) et les varicosités ont été marquées manuellement (fig. 23b axone 3). Les varicosités sont des renflements d'axones qui peuvent contenir des synapses. Ces synapses sont présentes lorsque les varicosités sont 1,5 fois plus grosses que le diamètre local (Florence & Casagrande, 1987; Gerfen *et al.*, 1987; Jensen & Killackey, 1987). C'est donc pour permettre de marquer de potentielles synapses que le critère de grosseur a été inclus dans l'étude. Ce diamètre des varicosités et le ratio par rapport au diamètre local axonal était calculé automatiquement par le logiciel NeuroLucida 360.

Par la suite, chaque coupe a été alignée avec la précédente et la suivante permettant d'aligner les contours de claustrum (fig. 23c), et pour permettre d'aligner les branches d'axones (fig. 23d). Les branches ont alors été rattachées ensemble (fig. 23e) pour reconstruire la totalité des axones dans leur longueur. De ce fait, les axones reconstruits sont visibles dans la structure du claustrum, permettant de voir leur distribution dans celui-ci (fig. 23f).

Il est important de mentionner que certaines parties des axones ont été reconstruites à la main, étant donné que leur diamètre était trop petit et que les branches étaient difficilement visibles sur les photomontages. De ce fait, elles ont été tracées en mode « live image » dans le logiciel NeuroLucida. Cette fonction ne permet pas de marquer les varicosités. De ce fait, certains bouts d'axones sont exempts de varicosités, mais cela ne veut pas dire qu'il n'y en avait pas, seulement qu'elles n'ont pas été marquées.

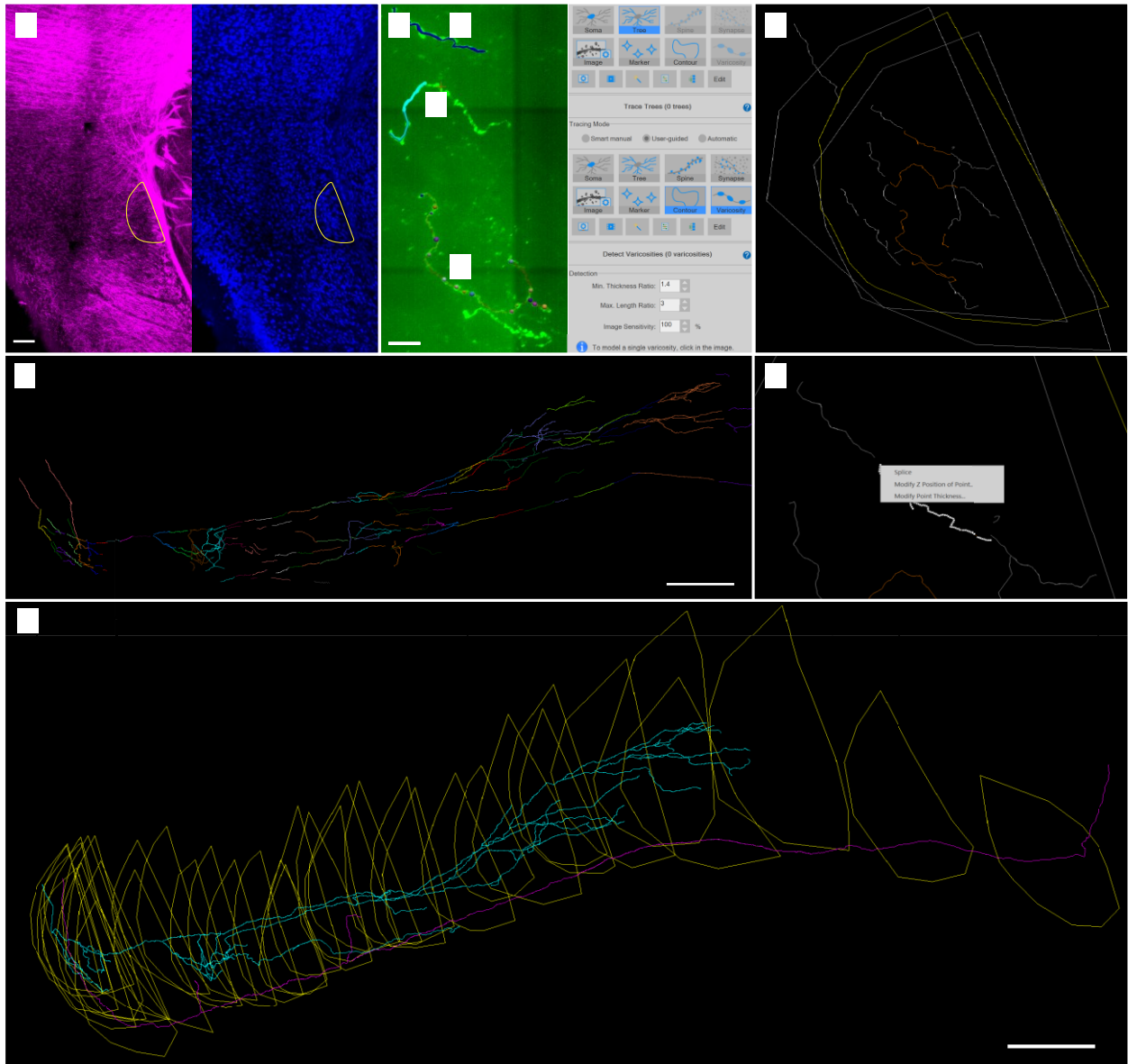


Figure 23. Étapes de reconstruction d'axones par le logiciel NeuroLucida360 (MBF Biosciences). Photomicrographie (10X) de MBP+ (magenta) et NeuN+ (bleu) et délimitations du claustrum en jaune (A). Échelle = 200 μm . Photomontage (100X) des axones du claustrum PHA-L+ (vert), tracés par le logiciel NL360. L'axone 1 est tracé, l'axone 2 est en cours de traçage et l'axone 3 est tracé et transparent avec varicosités marquées. Les fonctions du logiciel sont en gris (B). Échelle = 10 μm . Alignement de la présente coupe (axones orange + contours jaunes) avec les coupes avant et après (gris) (C). Alignement des branches des coupes pour la reconstruction complète de tous les axones. Échelle = 250 μm (D). Fonction utilisée pour lier les branches d'axones ensemble «Splice» (E). Résultat final de la reconstruction d'axones par l'alignement de toutes les coupes et la liaison des branches (F). Échelle = 250 μm .

L'analyse des données récoltées s'est déroulée en trois parties; l'analyse de la morphologie de l'axone en tant que tel, l'analyse des paramètres intéressants concernant les varicosités détectées, et finalement, des analyses statistiques ont été effectuées. La longueur ainsi que le diamètre des axones ont été mesurés. Le diamètre des axones a été calculé en excluant les branches reconstruites à la main, qui ont un diamètre constant qui n'est pas calculé automatiquement dans la reconstruction en « live image ». Le diamètre moyen des axones a été déterminé en calculant une moyenne pondérée des diamètres des branches selon leur longueur. Ensuite, la distribution des intervalles entre les varicosités, ainsi que leur diamètre ont été mesurés. Cette distribution des varicosités a également été calculée en excluant les branches qui ont été reconstruites à la main, étant donné que cela entraînait un grand écart entre les varicosités, parce qu'elles n'ont pas été marquées sur ces branches. Les données ont été récoltées à partir du logiciel NeuroLucida Explorer (MBF Bioscience). Les données sur le diamètre des varicosités et leur distribution provenant des projections du cortex V1 et du cortex V2M, ainsi que considérant la variable du côté de l'hémisphère (ipsilatéral et controlatéral) ont été comparées statistiquement avec des tests non paramétriques. Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel SPSS. Nous avons également démontré la proportion de l'axone reconstruit à la main en calculant le ratio de la longueur des branches qui avaient un diamètre constant (reconstruit à la main) sur la longueur totale de l'axone. Ces données sont présentées dans le tableau ci-dessous pour tous les axones reconstruits (n=22) (voir tableau 3, chapitre 3).

**Chapitre 3 : Projections of the visual cortex to the
claustrum in the mouse, a single axon study**

Title. Projections of the visual cortex to the claustrum in the mouse : a single axon study.

Running title. Axonal projections from V1 to the claustrum in the mouse.

Authors. Frigon, E.M. and Boire D.

Affiliations. Université du Québec à Trois-Rivières.

Acknowledgment. We would like to thank Jolanie Roy and Guillaume Laliberté for their help in some technical procedures.

Funding statement. This study was supported by NSERC grant to DB. EMF was supported by FRQS and NSERC.

Abstract

The claustrum is a subcortical telencephalic structure present in all mammalian brains. It is widely and reciprocally interconnected with almost the entire cerebral cortex. Stimuli from all sensory modalities elicit responses in claustral neurons and some studies report multimodal responses in the claustrum. In mice, sensory cortical projections to the claustrum exhibits a clear dorsoventral organization of distinct lines of projection. There is also a significant overlap of these sensory domains. Presently, there are no studies of the sensory cortical projections to the claustrum at the single axon level showing how visual information is distributed within the claustrum and how the projection patterns shown by bulk labelling studies, arise. Iontophoretic injections of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin were performed in the visual cortex of adult C57BL/6J mice. Individual axons of the projections from the primary and extrastriate visual cortices to the claustrum were reconstructed using NeuroLucida 360 software (MBF Biosciences). Labelled axons were found in the central region along the dorsoventral axis of the claustrum. Individual axons entered the claustrum from caudal levels and travelled for significant distances within the claustrum. Some poorly arborized axonal branches followed a straight trajectory for the whole length of the claustrum. Some branches showed more elaborate localized arborizations. Some collaterals of the main axon branched out, traveled more ventrally and returned to a linear rostral directed trajectory, and are well-suited to. Axonal branches of the visual projection to the claustrum leave the visual domain to branch out into domains of other sensory modalities. The local arborizations might suggest smaller modules within the longitudinal organization of the claustrum. Moreover, the labelled varicosities were distributed randomly along all the length of the axons suggesting the possible distribution pattern of synapses by a single visual neuron within the claustrum.

Keywords : claustrum, single-axon, visual cortex, axonal reconstruction, varicosities

Introduction

The claustrum is a bilateral thin sheet of gray matter, located between the insular cortex and the putamen present in all mammalian brains (Edelstein & Denaro, 2004; Kapakin, 2011). Although its shape varies between species, it appears as a dense group of neurons located in a region that is less densely myelinated than the surroundings (Wang *et al.*, 2017). Its functions have long remained elusive because of its small size and its location between external and extreme capsule of the cortical white matter, which make it difficult to manipulate, or to record its activity (Haines, 2004). Indeed, shutting down both claustrum without interfering with surrounding structures would be extremely delicate. To study the labelling of the claustrum, it would require precise injections (Crick & Koch, 2005), which are difficult to achieve without spread tracer (Torgerson & Van Horn, 2014). There are also few identified claustrum-specific neuroanatomical markers (Mathur, 2014).

The claustrum is the most interconnected brain structure per unit volume (Torgerson *et al.*, 2015). It maintains numerous direct reciprocal connections with almost all the neocortical areas (Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). It is also connected with subcortical areas such as the putamen, globus pallidus and lateral amygdala (Park *et al.*, 2012). Even though most cortical projections to the claustrum are bilateral, ipsilateral projections are generally stronger (Wang *et al.*, 2017). We also now know that the functions of the claustrum are related to its internal connectivity and its strong and reciprocal connectivity with the cortex. Indeed, the claustrum would play a role in the amplification and synchronization of cortical oscillations (Smythies *et al.*, 2012) and in attention (Goll *et al.*, 2015). Other hypothesis stipulate that it could also play a role in cognitive processes (Smith & Alloway, 2014; Brown *et al.*, 2017), multimodal integration and conscious percepts (Crick & Koch, 2005).

Anterograde labelling of the sensory cortical projections to the claustrum shows that they are organized in sensory specific longitudinal layers throughout the length of the claustrum. Specifically, projections from visual and auditory cortices terminate in the middle of the claustrum, while olfactory and somatosensory/motor projections terminate in the ventral and dorsal claustrum respectively. Prefrontal cortex appears to have projections distributed through all the dorsoventral extent of the claustrum (Atlan *et al.*, 2017). Moreover, the connections with

the frontal cortices such as prefrontal cortex and the cingulate cortex are very strong (Milardi *et al.*, 2015; Torgerson *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Single axon studies show target specific branching patterns that show the spatial distribution of potential synaptic contacts within defined structures (Rockland, 2002; Stepanyants & Chklovskii, 2005; Clasca, 2016; Mengual, 2016; Parent, 2016b; Rockland, 2020). How the modality specific projection lines within the claustrum arise by the contribution of single axons is presently unknown.

The specific anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine (PHA-L) was injected in the visual cortex of the mouse to label axons of cortical projections to the claustrum. Tree-dimensional axon reconstructions were performed with NeuroLucida 360 software (MBF Bioscience). Axonal varicosities were charted to show how the inputs for single axons are distributed into the claustrum and to better understand the internal organization of sensory projections to this structure.

Material and methods

Animals

Five C57BL/6J mice between 8 and 10 weeks received a tracer injection. Labelling density was very high in two mice, making reconstructions of individual axons in densely labelled areas difficult. Individual axons were reconstructed in three mice. They were raised in enriched environment with a controlled ventilation (45 to 60% humidity) and controlled temperature (between 20 and 25°C) on 12 hours a day of light. All procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the ethics committees of the Université du Québec à Trois-Rivières.

Surgery

Prior to surgery, animals received subcutaneous injections of Buprenorphine (0.1 mg/Kg) and sterile saline (0.5 ml). Anaesthesia was induced with 5% isoflurane in O₂ and maintained at 2% throughout the surgical procedure. Lubricant eye gel (Tear-Gel®, ALCON) was applied to avoid corneal dehydration. Animals were placed in a stereotaxic apparatus and a scalp incision was performed to expose the skull. A burr hole was performed at the targeted coordinates and a glass pipette (CA 20 µm diameter, see table 1) filled with 2.5% *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin

was inserted into the brain. PHA-L was delivered iontophoretically using a 2 μ A positive current with a 7s ON/OFF duty cycle for 10 minutes at two cortical depths (for the injection parameters, see table 1). After the injection, the pipette was removed and the skin was sutured. Carprofen (12.5 mg/Kg; Rimadyl®) was administered subcutaneously to control inflammation. After one-week survival, the mouse was perfused with PBS 0.1M and paraformaldehyde (PFA) 4% intraventricularly. The brain was extracted from the skull and post-fixed in PFA 4% for an hour and a half. It was then placed in a sucrose 30% solution in PBS 0.1M overnight for cryoprotection. The brain was frozen in dry ice and conserved at -80 degrees until further processing.

Table 1 – Injection parameters

Injection site	Case code	Coordinates from Bregma (mm)			Current (μ A)	Tip (μ m)	On/Off (sec)	Duration (min)
		AP	Depth	ML				
V1	AD1	-3.00	-0.80/-0.65	-1.73	2	21	7	2x15
V1	AD3	-3.50	-0.75/-0.90	-2.25	2	23	7	2x15
V2M	AC4	-2.70	-0.65/-0.80	-1.20	2	20	7	2x15

Histology

The brains were cut into 80 μ m coronal sections with a sledge microtome (Leica, Model SM2400, #0601/062.007). Sections were rinsed three times in 0.1M PBS and then placed in a 50% methanol solution for twenty minutes. They were rinsed again before they were incubated in blocking solution (1% Normal donkey serum, 0.1M glycine and 2% Triton-X-100 in 0.1M PBS) at 37°C overnight. Sections were then placed in primary antibody solution (Goat anti-PHA-L (1:1000), rabbit anti-MBP (myelin basic protein) (1:1000) and guinea pig anti-NeuN (1:6000) in blocking solution) (see table 2) for 72 hours at 37°C. They were rinsed three times in PBS 0.1M and then incubated in secondary antibody solution for 2 hours at 37°C (anti-goat Alexa 488 (1:500), anti-rabbit Alexa 555 (1:500) et anti-guinea pig Alexa 647 (1:500) in blocking solution) (see table 2). The sections were rinsed again and placed on gelatine-subbed slides. Great care was taken to keep every section and to maintain them in order. The sections were then dehydrated in graded ethanol and cleared in xylenes and coverslipped.

Table 2 – Antibodies

Primary antibodies	Animal	Laboratory	Dilution	Code
Myelin Basic protein	Rabbit	Abcam	1:1000	ab40390
Phaseolus	Goat	Vector laboratories	1:1000	AS-2224
NeuN	Guinea pig	Millipore Sigma	1:6000	ABN90
Secondary antibodies	Animal	Laboratory	Dilution	Code
Goat Alexa Fluor 488	Donkey	Jackson laboratories	1:500	AB_2336933
Rabbit Alexa Fluor 555	Donkey	Biologend	1:500	406412
Guinea pig Alexa Fluor 647	Donkey	Jackson laboratories	1:500	706-605-148

Microscopy

Low-power magnification of MBP (figure 2b) and NeuN (figure 2c) staining (10X, UPlanSApo 10X/0.40 ∞ /0.17/FN26.5 UIS2) were taken for every section to delineate the claustrum. High-power stacks (image thickness of 15 μ m distanced with 0.2 μ m which makes 75 images/stacks) of PHA-L labelled axons (100X, UPlanSApo 100X/1.40Oil ∞ /0.17/FN26.5 UIS2) were taken in every section through the claustrum (figure 2d-e) with a DSU spinning disk confocal microscope (Olympus BX51W1) controlled by NeuroLucida (MBF Bioscience).

Analysis

The image stacks of PHA-L labeled axons segments were opened in NeuroLucida 360 (MBF Bioscience) to trace every axon in 3D with the *user-guided tool* and to manually label the varicosities. Varicosities are recognized as axon swelling that are potential sites bearing synaptic contacts. Those synapses are present when the size of the varicosities is over 1.5 times the local axonal diameter (Florence & Casagrande, 1987; Gerfen *et al.*, 1987; Jensen & Killackey, 1987). To label potential synapses, we included the criteria of the size of the varicosity to this study and the ratio between the varicosity diameter and the local caliber of the axon was calculated automatically in NeuroLucida 360 software. Sections were then registered to reconstruct the 3D claustrum and the axon segments were spliced together to reconstruct the whole axons along the full length of the claustrum. Axons were then analyzed with NeuroLucida Explorer (MBF Bioscience) to obtain axonal diameter and length and varicosity number, size and linear distribution along the length of the axon. To compare the maximal diameter of the varicosities

between the different projection groups (V1, V2M ipsilateral and V2M contralateral), a Kruskal-Wallis test was used. A Spearman correlation was used for the linear regression of the Poisson distribution between the mean and the standard deviation of the intervals between the varicosities. Every statistical analysis was made using SPSS software.

Results

One mouse (AC4) was injected into the medial secondary visual cortex (figure 1a) and two mice (AD1 and AD3) were injected in the primary visual cortex (figure 1b and 1c). This led to a comparative study of the projections of the primary visual cortex to the claustrum and the projections of extrastriate visual cortices to the claustrum. The injection sites of V1 overflowed into the white matter, but the dense projection to the lateral geniculate nucleus, (seen in figure 1b) confirms that the labeling comes from V1 (reference).

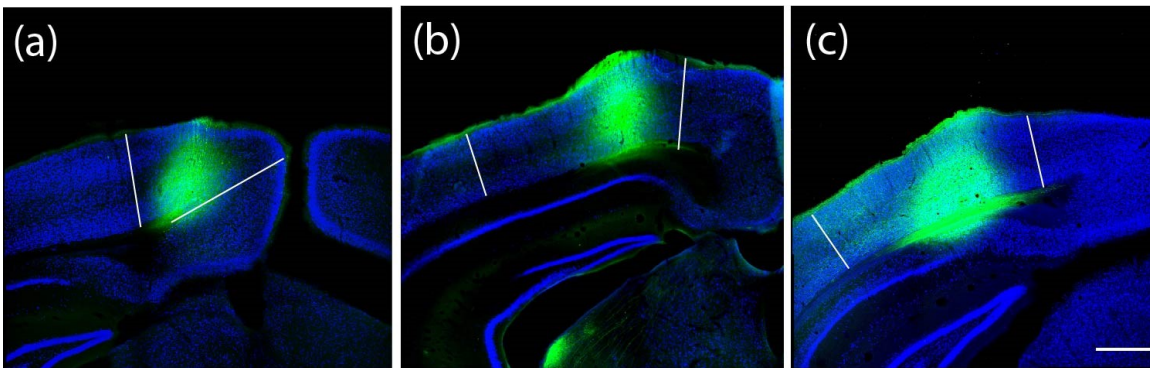


Figure 1 - Injection sites in the 3 specimens. Photomicrographs of NeuN (blue) (help to delineate the cortices) and PHA-L (green) which represent the injection sites of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin of specimen AC4 (A), AD1 (B) and AD3 (C). The white lines delimit V2M (medial extrastriate visual area) of AC4 (A) and V1 (primary visual cortex) of AD1 (B) and AD3 (C). Scale bar = 500 μ m.

NeuN and MBP immunostaining permitted clear delineation of the claustrum boundaries (figure 2a-b-c). As previously shown, it appeared as a densely packed group of neurons in a myelin-poor ovoid region between the external capsule and insular cortices (Wang *et al.*, 2017). Higher power photomicrographs show here that the PHA-L labelled cortical projection axons in the claustrum were not myelinated (figure 2d). PHA-L injections in visual cortices produced distinctly labelled axons throughout the claustrum. Although the injections were relatively large, the density of the labelled axons in the claustrum was quite low allowing for unambiguous reconstructions of individual arbors (figure 2e). Labelled axons were generally thin and poorly branched in individual sections. Localized swellings of axon diameter indicated the presence of

individual varicosities that were charted along the axon's trajectories (figure 2e). All the axons from the visual cortex entered the claustrum by its caudal most extremity and extended for various lengths rostrally.

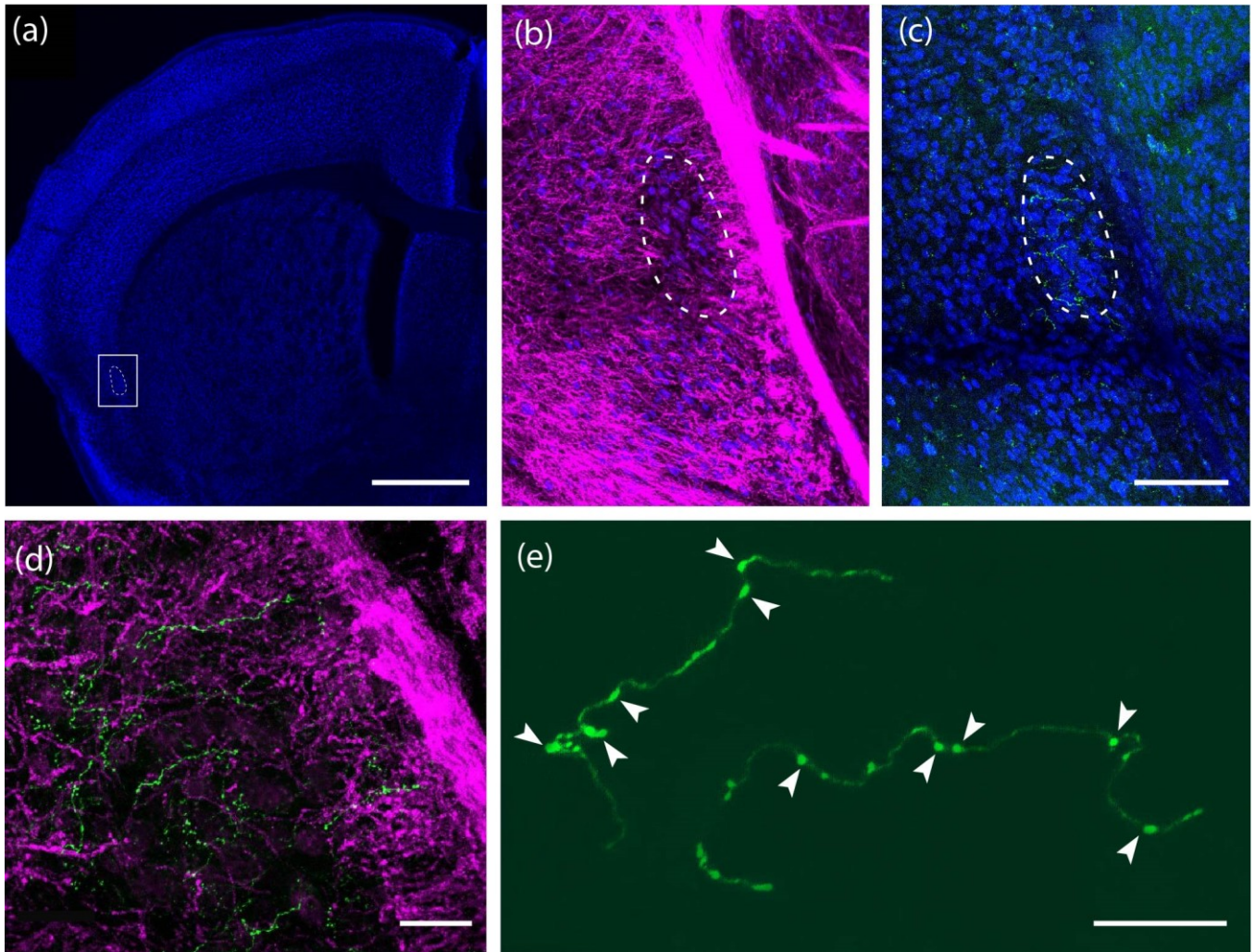


Figure 2 – Claustrum delineation, myelination and labeled axons. A) Photomicrographs (10X) of a coronal section (0,4mm from bregma) of the mouse brain in NeuN staining. Scale bar = 1mm. B and C) Magnification of the white square in A. Photomicrographs (10X) of MBP staining (magenta) (B) and NeuN (blue) (C) with the delineated claustrum in white dot contours. Scale bar = 200 μ m for both pictures. D) Photomicrograph (40X) of MBP (magenta) and PHA-L (green) double staining that illustrates non-myelinated axons. Scale bar = 25 μ m. E) Photomicrographs (100X) of PHA-L immunostaining showing 3 axons. White arrows point varicosities on the axons. Scale bar = 10 μ m.

Our observations are based on the reconstruction of 22 axons (table 3). The axonal branches were reconstructed from their entry point in the claustrum and followed for their whole trajectory within the claustrum until they either terminated or exited the claustrum. Some axons

were traced after exiting the claustrum into the striatum and some were also traced towards the injection site to search for earlier bifurcation.

The total length of the reconstructed axons is ranged between 421,61 μm and 12 265,97 μm after applying a shrinkage correction of 5,33. The nominal section thickness of 80 μm was on average 15 μm after sections were dehydrated and mounted.

Table 3 – Description of every reconstructed axon

	Animal	Cortex	Hemisphere	Total length (μm)	Average diameter (μm)	Length of the manually reconstructed axons (%)	n branch order
1	AC4	V2M	Contra	4283,47	0,704	65,74	3
2	AC4	V2M	Contra	12 265,97	0,959	12,25	22
3	AC4	V2M	Ipsi	1219,59	0,840	9,05	1
4	AC4	V2M	Ipsi	803,21	0,868	0	5
5	AC4	V2M	Ipsi	421,61	0,855	0	1
6	AC4	V2M	Ipsi	564,04	0,802	0	1
7	AC4	V2M	Ipsi	1785,33	0,723	24,12	3
8	AC4	V2M	Ipsi	1638,40	0,778	4,87	3
9	AC4	V2M	Ipsi	2946,38	0,712	37,26	5
10	AC4	V2M	Ipsi	3093,77	0,724	9,05	4
11	AC4	V2M	Ipsi	3164,11	0,674	18,94	2
12	AC4	V2M	Ipsi	4138,18	0,676	14,95	6
13	AC4	V2M	Ipsi	5684,72	0,789	22,11	9
14	AD1	V1	Ipsi	765,46	0,706	4,26	1
15	AD1	V1	Ipsi	1232,86	0,635	19,72	4
16	AD1	V1	Ipsi	1168,47	0,665	40,38	1
17	AD1	V1	Ipsi	5809,23	0,773	40,14	7
18	AD3	V1	Ipsi	715,97	0,614	23,28	1
19	AD3	V1	Ipsi	1637,39	0,629	3,67	2
20	AD3	V1	Ipsi	4806,07	0,658	13,82	8
21	AD3	V1	Ipsi	10 512,58	0,805	14,69	11
22	AD3	V1	Ipsi	9766,56	0,900	35,75	12

The reconstructed axons of our sample are very thin. The estimated average diameter of the axons, (figure 3) ranges from 0,614 μm to 0,959 μm and the length weighted average of the whole sample of axons is 0,792 μm . These averages were calculated for each axon by obtaining the diameter of every segment/branches of the axons and multiply it by the length of this

branch. The sum of those results for every branch was made and divided by the total length of the axon. Some axons were invisible on the taken stacks because of the too small branches and those parts were reconstructed live on the microscope instead of NL360. We calculated the proportion of the missing data. The proportion of the axon that was reconstructed manually, which means that has no diameter and no varicosity data on those branches, was calculated by a ratio between the length of the axon that had a very little constant diameter (that meant it was reconstructed by hand) and the total length of the claustrum.

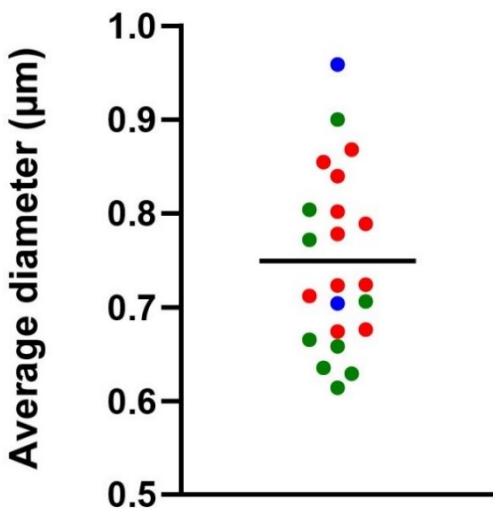


Figure 3 – Violin graph of the weighted average axonal diameters. Black horizontal line shows the average of the axonal diameters of every axon, which is 0,792 µm (0,749 non weighted), (ranged

The reconstructed axons within the claustrum of each specimen are shown in figure 4. Most axons travelled for distances of 2-3 mm from the caudal to the rostral pole through the full length of the claustrum (green shell). Some axons were shorter remaining in the caudal pole of the claustrum for distances of only 500-1000µm (table 3). As expected (Wang *et al.*, 2017), the injections in the primary visual cortex produced labelled axons in the ipsilateral claustrum only in both cases AD1 and AD3 and injections in the medial extrastriate visual cortex produced labelled axons bilaterally. In the case AD1 (figure 4a), four axons were reconstructed: three short axons that remained in the caudal pole of the claustrum, and a long poorly branched axon that had one branch that extended for the full length of the claustrum. The other branches either course alongside the main longer branch or coursed more ventrally in the claustrum also parallel to the other branches. In the case AD3, also injected in the primary visual cortex, labelled 5

axons in the ipsilateral claustrum (figure 4b). Of these, three travel for almost the full length of the claustrum and two are short and remain in the caudal tier. Together, the three longer axons form a denser line of projection with more profuse axonal branching. From this line of projection, isolated unbranched collaterals course ventrally and pursue their trajectory parallel to the main line of projection. One of the longer axons exited the claustrum rostrally and pursued its course in the striatum. The reconstruction of this particular branch is incomplete as the very fine branches within the striatum were difficult to follow consistently through adjacent sections. In the case AC4 (figure 4c-d), eleven axons were reconstructed in the claustrum ipsilateral to the V2M injection (figure 4c). Seven axons were quite short and poorly branched, two were long and linear with no significant branching and two were long and emitted a few collateral branches. The combined axons did not form a distinct line of projection in the claustrum but they rather followed almost parallel linear courses at different dorso-ventral levels within the claustrum. The short axons remained in the caudal most claustrum forming a compact “bunch”. In this case, two axons were reconstructed in the claustrum contralateral to the PHA-L injection (figure 4d). One axon travelled for more than half the length of the claustrum and branched profusely forming a compact line of projection in the middle axis of the structure. The other axon was very linear and emitted only a few short side branches. It coursed ventral and parallel to the projection of the other axon for the full length of the claustrum. The axon also exited the claustrum for its rostral end to pursue its course in the striatum. Here also the reconstructions within the striatum were incomplete.

The branching pattern of the reconstructed axons suggests three main patterns; long and branched axons, long and linear axons, and short axons (figure 5). It is interesting to note with this categorization that every short branch are projections of the cortex to the ipsilateral claustrum only. Every contralateral branch coming from V2M are very long, but $n=2$ is too small to make generalizations. Moreover, in the long and linear category, there is no axon coming from V1. Only V2M axons are long and linear; V1 are long and branched, or short. There are a lot of red axons in the short category, mostly because of the density in the beginning of the AC4 ipsilateral claustrum (figure 5b).

In order to see if visual cortical projection axons to the claustrum are dedicated to this structure or whether they have collateral branches to other targets, eight axons were reconstructed from their entry in the caudal end of the claustrum within the external capsule towards the cortical injection site (figure 6).

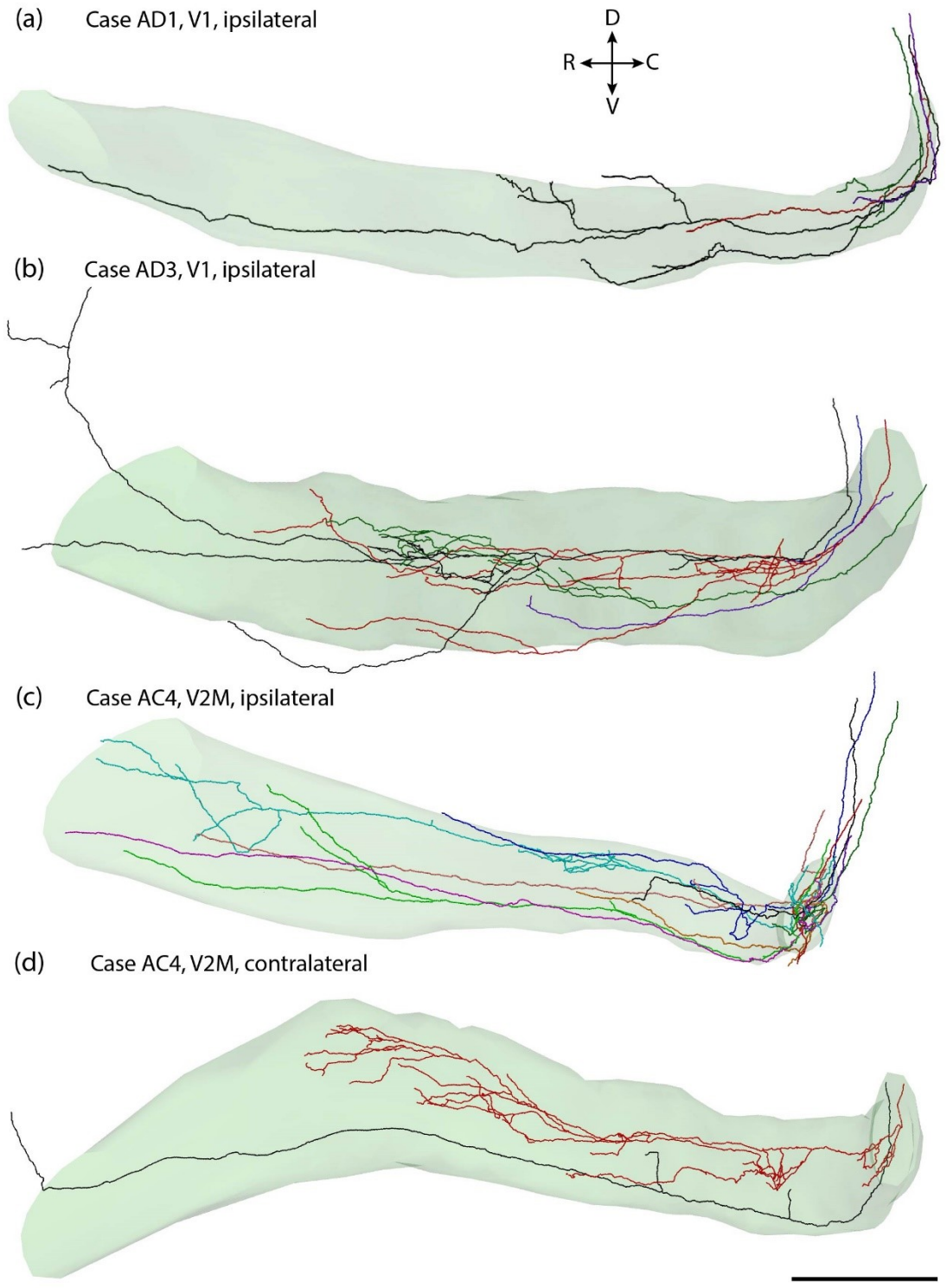
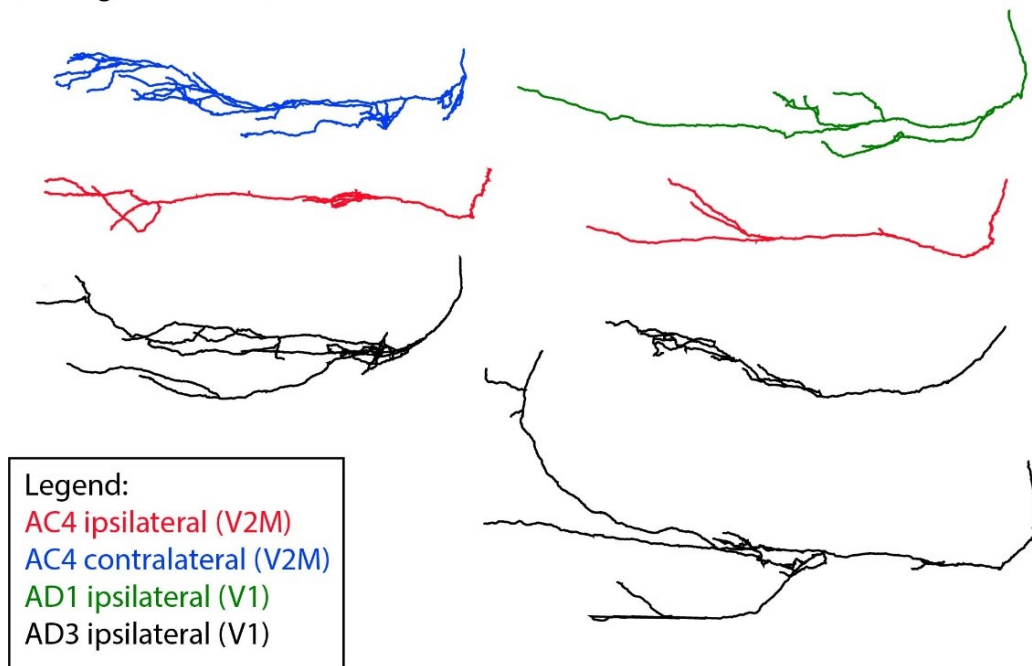
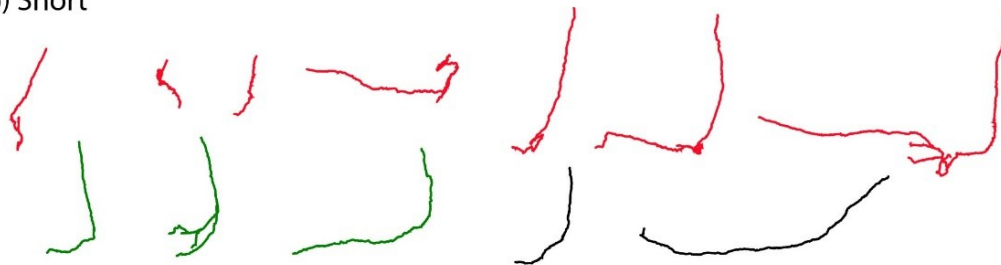


Figure 4 – Tree-dimensional axon reconstructions in claustra shells. Reconstructed axons of the projections from the primary visual cortex to the ipsilateral claustrum of specimens AD1 (A) and AD3 (B). Reconstructed axons of the projections from the medial secondary visual cortex to the ipsilateral claustrum of specimen AC4 (C), and to the contralateral claustrum of specimen AC4 (D). The black arrows show the dorso-ventral axis (D and V) and the rostro-caudal axis (R and C). Scale bar = 500 μ m.

(a) Long and branched



(b) Short



(c) Long and linear

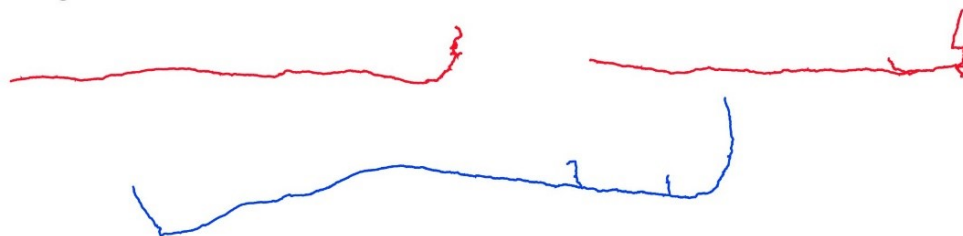


Figure 5 – Reconstructed axons, shown separately in different categories to better see the branches and the morphology. Blue axons are secondary visual cortex projections to the contralateral claustrum (AC4); Red axons are secondary visual cortex projections to the ipsilateral claustrum (AC4); Black axons are primary visual cortex projections to the ipsilateral claustrum (AD3) and green axons are primary visual cortex projections to the ipsilateral claustrum (AD1). A) Ramified reconstructed axons that travels all the length of the claustrum. B) Small and short axon, with no or almost no ramifications, that stops their way at the beginning of the claustrum. C) Linear axons that travel all the length of the claustrum, with no collaterals. See the legend for the cortex which the axons are from (V2M or V1), the specimen (AC4, AD1, AD3) and if the axons are in the ipsilateral or contralateral claustrum. Scale bar = 500 μ m.

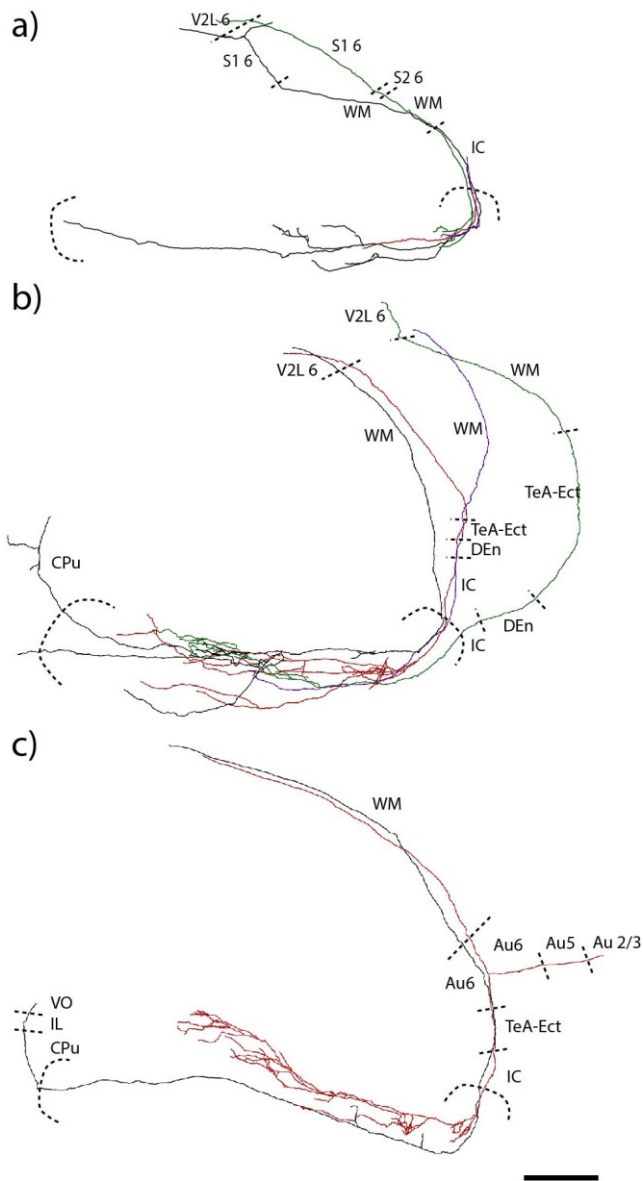


Figure 6 – Tridimensional reconstruction of the axons from the caudal end of the claustrum to the injection site, and from the rostral end of the claustrum to other structures. Reconstructions of labelled axons from ipsilateral primary visual cortex of case AD1 (A) and case AD3 (B) and from contralateral V2M in case AC4 (C). The boundaries of the claustrum indicated by the curved lines. The other straight dotted lines indicate the regions through which the axons are passing. Scale bars = 500 μ m.

Six axons were reconstructed upstream toward the injection site in the two cases that received PHA-L injections in V1 (figure 6a-b). In the case AD1, one axon had a right-angle bifurcation giving rise to a collateral branch going into the lateral extrastriate visual cortex (figure 6a). This

branch was not reconstructed in further details. No bifurcations were observed in the axons of case AD3 (figure 6b). Two axons were followed toward the injections delivered in V2M (figure 6c). Of these axons targeting the contralateral claustrum showed a right-angle bifurcation in the white matter underlying the auditory cortex producing a branch that ascended radially toward the superficial layers 2/3 of this cortex. The reconstructions were pursued further toward the injection sites and no further bifurcations were observed in this case (figure 6c). In general, the axons travelled mostly in the external capsule white matter (WM). The axon also cross cortices like the insular cortex (IC), the endopiriform nucleus (DEn) and the temporal and entorhinal cortex (TeA-Ect) before travelling further into the white matter. Case AD1 (figure 6a) also cross the somatosensory cortex before going into the secondary lateral visual cortex. The reconstructions were terminated as they approached the bright fluorescent halo formed by the cortical injections and were intermingled with the dense lattice of labelled axons surrounding the injection site that did not permit unambiguous reconstructions.

We also followed two axons outside of the claustrum as they exited the rostral pole of the claustrum. One from the injection in V1 that targeted the ipsilateral claustrum and one in V2M and targeting the contralateral claustrum (black axons of cases AD3 (figure 6b) and AC4 contralateral (figure 6c)). Both axons pursued their trajectory into the caudate putamen (Cpu) of the striatum. The latter could be followed further as it entered the frontal infralimbic (IL) and ventral orbital (VO) cortices (figure 6c). Those axons were also difficult to follow, because visual cortex projects itself to the striatum, so multiple axons were marked in those regions; it was difficult to differentiate the axons.

Local axonal swellings were charted along the axonal trajectories using the varicosity detection functionalities of MBF NeuroLucida 360. Varicosities were scored when their diameter exceeded the local diameter of the axon by a factor of 1.5. Some axonal segments were difficult to reconstruct with the semi-automatic user guided reconstruction and were charted in a manual mode. This mode of reconstruction does not allow varicosity detection and charting, therefore there were some axonal segments on which no varicosities were charted. The linear density of varicosities is expressed by dividing the total number of varicosities on each axon by the total length of the axonal segments for which varicosities were charted. In order to test the hypothesis

that the varicosities are distributed randomly along the axon without particular aggregation, the distance to previous function was used. A random distribution without significant aggregation of varicosities should result in a Poisson distribution of these distances, as shown in figure 7b, according to the frequency of the intervals between the varicosities of every axon.

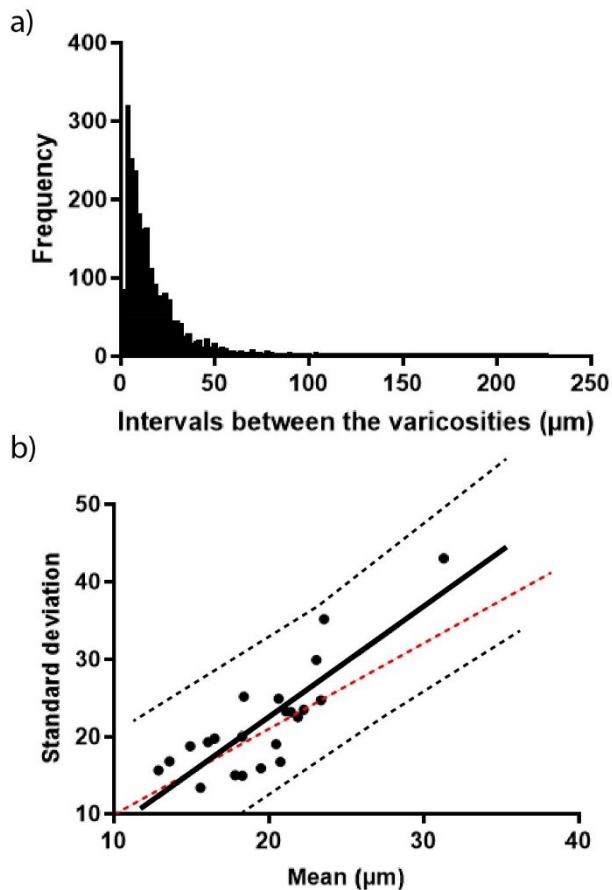


Figure 7 – A) Frequency distribution of the intervals between the varicosities. We can notice that in majority, the distance between the varicosity is very small (around 10μm), but sometimes they are separated by a long distance (until 226 μm). B) Distribution of the standard deviation in function of the mean intervals between the varicosities (μm) of every reconstructed axon (n=22). The thick black line represents the linear regression of the intervals between varicosities. The red dotted line indicates the linear regression of a perfect Poisson distribution. The black dotted lines represent the confidence intervals (95%).

To test the hypothesis that the distribution of varicosities along axons is random, the standard deviation and the mean interval between the varicosities were plotted for each axon (figure 7). There was a significant correlation between standard deviation and mean spacing (Spearman

correlation coefficient = 0,747, $p < 0,0001$). The linear regression between these variables had a slope of 1,432. The unity value is within the 95% confidence interval which ranges between 0,977 and 1,886, indicating that the distribution of varicosities is random and follows a Poisson distribution.

The maximal diameter of the varicosities was also calculated (figure 8). The general average of the maximal diameter was $0,979 \pm 0,26 \mu\text{m}$. The maximal diameter of varicosities from the ipsilateral V2M was significantly greater (mean = $1,087 \pm 0,262$) than those from the contralateral V2M (mean = $1,042 \pm 0,259$) and V1 (mean = $0,945 \pm 0,245$) ($p < 0,0001$). Varicosities from the contralateral V2M were also significantly larger than those from V1 ($p < 0,0001$). However, the Cohen d statistic (0,245 for V1-V2Mcontra; 0,266 for V2Mipsi-V2Mcontra; 0,259 for V1-V2Mipsi) indicates these differences between the maximal diameter of the varicosities to be weak.

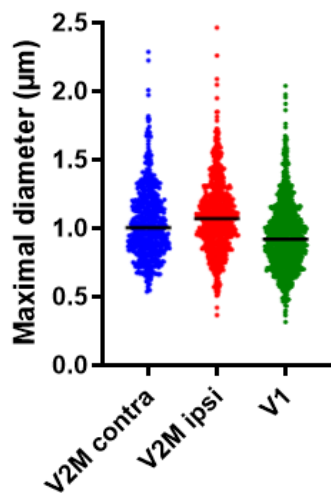


Figure 8 – Violin graphs of the maximal diameter of the varicosities. Blue : V2M contralateral (AC4), Red : V2M ipsilateral (AC4), Green : V1 (AD1 and AD3). This shows an average of approximately $1 \mu\text{m}$ of diameter.

Discussion

The anterograde labelling observed following PHA-L injections in visual cortices was consistent with prior reports of visual cortical projections (Coogan & Burkhalter, 1990; 1993; Wang & Burkhalter, 2007). Both injections produced labelled axons and terminal fields in several extrastriate visual cortical areas and in the dorsal lateral geniculate and lateral posterior thalamus. The injection in the primary visual cortex produced labelled axons in the ipsilateral claustrum only, whereas the injection in the medial extrastriate cortex labelled axons bilaterally in the claustrum, consistent with previous reports (Wang *et al.*, 2017). Although retrograde labelling can occasionally be observed following PHA-L injections, no retrogradely labeled neuronal cell bodies were observed in this material. Therefore, the labelled axons described certainly originate from cortical neurons and not from claustral neurons.

The present results provide novel information on the spatial distribution of individual axons and their terminals from the visual cortex to the claustrum in the mouse. Although the sample of axons presented here might not represent a comprehensive sample of the cortico-claustral projection axonal morphologies, some recurrent aspects even within this small sample, do suggest important features of visual projections to the claustrum.

The degree with which our axonal reconstructions within the claustrum were complete is difficult to assess. The axons were reconstructed as they entered the claustrum until they either ended or became so small and ill-defined that unambiguous reconstruction could not be pursued. It is therefore quite likely that the finer branches of these axons were not charted. Some axonal segments were seen traversing the claustrum for just a few sections without any significant branching. These axon segments were not retained in the present analysis. Some axonal segments entered the claustrum and travelled only short distances before ending with a club-like terminal within the depth of the section. This indicated a genuine ending and not a “cut” axon. These segments were conserved in the present sample, but these mainly short axons were not reconstructed outside the claustrum.

The reconstructed axons were all very thin and unmyelinated. There are few accounts of the caliber and arbor structure of cortico-claustral projection axons. Axons of the striate projection to the claustrum in the tree shrew were reported to be thin (Day-Brown *et al.*, 2017), although

this study does not provide actual measurements of axonal calibers. Moreover, none the PHA-L labelled axons within the claustrum were myelinated. This is in agreement with the observations that the claustrum in mouse (Wang *et al.*, 2017) and marmoset (Pham *et al.*, 2019) is less myelinated than the surrounding structures. In our material, some myelinated fibers crisscrossed the claustrum profile, but none of these were labeled cortical projection axons. Similarly, intrinsic myelinated fibers were also described in the marmoset claustrum (Pham *et al.*, 2019). The very small caliber and absence of a myelin sheath on visual cortico-claustral axons suggest slow conduction speeds for these axons. The range of the axonal shown here would correspond to conduction velocities of approximately 1 ms^{-1} (Wen & Chklovskii, 2010). Considering the total length of the mouse claustrum of approximately 2-3 mm, this would mean that the conduction delay between the caudal and rostral end of the claustrum would be approximately 2-3 ms. These delays are crude approximations as they do not consider other morphological features of axons that can affect conduction velocity and delays such as branch points and local axonal varicosities (see Debanne, 2004), however, they are commensurate with estimated delays in corticocortical and callosal connections in monkeys (Tomasi *et al.*, 2012).

The reconstructions of axons of the visual cortical projections suggest mainly two modes of spatial distribution of these inputs within the claustrum. Firstly, we observe axonal segment that exhibit a very linear unbranched morphology. This is mainly what was observed for the short and the long and linear axonal segments. Similarly, such linear unbranched and often quite lengthy segments were also observed as collaterals of axon bearing other more profusely branched collaterals. In addition, some axon collaterals showed a more profuse localized branching pattern. The linear axonal segments bear resemblance to type I corticothalamic projection axons that possess long thin branches with occasional *en passant* swelling and “drumstick-like” side branches (Rockland, 1994; 1996). As shown here in the mouse, the more arborized branches of cortico-claustral axons bear only cursory similarities with type II corticothalamic axons; they are much thinner than these corticothalamic axons and not bear very large terminals, as also shown in the treeshrew (Day-Brown *et al.*, 2017).

Whereas bulk labelling of neuronal projections show the overall distribution of information to a specific area, the structure of single axons can show more specific patterns within structures.

The arrangement of labelled axons within the claustrum shows a denser concentration of axons through the middle axis of the claustrum, which corresponds to the visual domain of the structure. Bulk labelling of sensory cortical projections to the claustrum has shown that each sensory modality forms an elongate line of projection throughout the length of the claustrum (Atlan *et al.*, 2017). The single axons shown here, although poorly arborized, form a denser projection along such a projection line. This projection pattern thus arises from these longitudinal axonal branches that travel for significant distances within this line of projection. In addition to this denser central projection, individual longitudinal axonal branches diverge from the main projection and pursue their trajectory more ventrally without any significant branching. These branches suggest that visual information can be conveyed to domains within the claustrum attributed to other sensory modalities. Whether this projection pattern can be generalized is presently unknown. Sensory modality specific projections to particular sectors of the claustrum has been shown in the dorsocaudal portion of the claustrum in the cat (Sanides & Buchholtz, 1979) and in the ventral portion in the rhesus monkey (Remedios *et al.*, 2010). Single axon studies are lacking in the claustrum in these species and axonal branches outside these modalities-specific sensory domains have not been documented.

It has been suggested that, due to its high connectivity with many cortical regions, the claustrum might play a role in multisensory integration and functional studies in humans have supported this hypothesis (Hadjikhani & Roland, 1998; Banati *et al.*, 2000; Naghavi *et al.*, 2007). Whereas some studies have noted multimodal sensory responses in claustrum neurons (Segundo & Machne, 1956; Spector *et al.*, 1974; Clarey & Irvine, 1986), which could enhance the efficacy of the claustrum in its role in attention by merging two modalities together (Goll *et al.*, 2015), others show distinct modality specific responses (Olson & Graybiel, 1980; Sherk & LeVay, 1981; Remedios *et al.*, 2010). We show here that the isolated individual axonal branches that venture into the territories of non-visual domains do not form a high density projection and one might surmise that this cross-modal input be rather weak and insufficient to trigger supraliminal responses of claustral neurons.

In our sample of axons, we show here for the first time collateral branches to claustrum and striatum for a primary sensory cortex. Indeed, two individual axons travelled through the

claustrum and entered the striatum and orbital cortices. Other axons in our sample might also enter these structures but these branches were too fine or incompletely filled to be followed further. There are few mentions of single axons of cortical projections that project to both claustrum and striatum. Single axons of cortico-striatal projection neurons from prelimbic cortex in rats (Lévesque & Parent, 1998) and motor cortex in monkeys (Parent & Parent, 2006; Parent, 2016a) were shown to emit collaterals to the claustrum (Lévesque & Parent, 1998; Parent & Parent, 2006; Parent, 2016a). Although projections between the frontal cortex (Kemp & Powell, 1970; Künzle & Akert, 1977; Jürgens, 1984; Selemon & Goldman-Rakic, 1988; Stanton *et al.*, 1988) and visual cortex to both the striatum and claustrum have been shown in several species, the above-mentioned single axon studies and our results show that some single axons of cortical projections can target both structures (Parent & Parent, 2006). In addition, the claustrum is reciprocally connected with the striatum (Wang, 2018; Borra *et al.*, 2020). Moreover, some axons of thalamocortical projection neurons from paracentral and central lateral nuclei also have collateral branches to striatum and claustrum (Clasca, 2016) further stressing the intricate relationships between these structures. These observations support the importance of the claustrum in a cortico-subcortical circuitry involved in integrating limbic motor and sensory information.

In order to know whether axons of this cortical projection to the claustrum send collateral branches to other cortical areas, some axons were followed towards the injection site. Two axons from the primary visual cortex were observed branching into lateral extrastriate visual cortex and one axon from V2M branched into auditory cortex. These results show that visual corticoclastral projection neurons can establish connections to other visual areas as well as to areas of the other sensory modalities. These collateral branches could be involved and supportive of the role of the claustrum in the synchronization of cortical activity (Smythies, 2014). Many axons can have several collateral branches to different targets (Rockland, 2013; 2018; 2019). Branching visual cortical axons is more ubiquitous than previously thought. Indeed, a previous study showed that about 40% of visual corticocortical projection neurons target two to seven other cortical areas (Han *et al.*, 2018). This led to the suggestion that a minority of visual cortex projection neurons are dedicated to specialized visual information specific to their unique target, and that the majority of neurons share information in a form

suitable for a varied subset of targets (Han *et al.*, 2018). The properties of sensory responses in the claustrum could suggest that it receives less specialized information conveyed by such “broadcast” neurons that might project to varied targets. Indeed visual, auditory and somatosensory responses in the claustrum show much less specific properties than the corresponding sensory cortices. For example, claustral neurons show no orientation selectivity, auditory claustrum neurons are not tightly tuned and somatosensory claustrum show a limited repertoire of somatosensory responses (see Goll *et al.*, 2015 for review). This could suggest that the majority of cortical projections to the claustrum also send collateral branches to other targets not limited to a single sensory modality. The degree of branching of our visual projections to the claustrum is likely underestimated. Collateral branching to auditory cortex occurred far from the injection site in one axon and branches to other visual areas occurred much closer to the injection site. In the reconstructed visual cortical axons, many emitted branches in the close vicinity of the parent neurons in the visual cortex (Han *et al.*, 2018). The dense fluorescent halo surrounding the injection site made it impossible to follow the axons to the cell body and axon bifurcation within this halo would have been overlooked. Furthermore, reconstructed axons in the Mouselight database shows that most cortical neurons that target the claustrum terminate in multiple other targets. In addition to branching into other cortical areas, some axons travelled for some distances within the cortical gray matter and axonal varicosities were observed along these trajectories. These varicosities can indicate potential synaptic contacts to somatosensory, insular and temporal cortices even in the absence of conspicuous elaborate arbors within these cortices.

The varicosities in the present material were mostly distributed along the generally linear path of the axons although occasional club-like stalked terminals were also observed. The size and distribution of varicosities are commensurate with previously reported observation in the treeshrew. Indeed, axons were reported to form small boutons in a “beads on a string” manner or slightly larger terminal grouped in clusters (Day-Brown *et al.*, 2017). Clustered varicosities were not observed in the present material. Either these clusters are uncommon in the mouse or they might be more frequent in tree-shrew.

Varicosities were mapped on the axons and they appear to be randomly distributed along all the length of the claustrum. Axonal varicosities are good markers for potential presynaptic sites

(McGuire *et al.*, 1984; Hellwig *et al.*, 1994). We find no evidence for a contagious distribution of the varicosities along the axons. Indeed, the spacing between varicosities does not differ significantly that what would be expected. A similar random distribution of varicosities has been reported in cortical pyramidal local axons (Hellwig *et al.*, 1994). As in their study, we use the standard deviation (SD)/mean ratio as a statistical estimator of homogeneity of event distribution. In a Poisson process, this ratio is unity, higher values indicate heterogeneity and lower values, homogeneity. SD and mean spacing between varicosities were significantly correlated and the regression slope did not significantly differ than unity showing a random distribution of the varicosities for all the axons that were reconstructed here. In a similar study, the distribution of varicosities along hippocampus perforant axons was shown to be more homogeneous (Shepherd *et al.*, 2002). Similar patterns were also observed for neocortical axons (Amir *et al.*, 1993; Hellwig *et al.*, 1994; Kincaid *et al.*, 1998; Lübke *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2000; Shepherd *et al.*, 2002). Varicosity clustering could indicate spatial specificity of neural connections. The random distribution of potential synaptic contacts along the linear poorly branched paths of the reconstructed axons does not support local high input density. Our results show that corticoclaustral axons travel in rather straight lines. This also indicates that contacts are established randomly along their path and that axons do not seek out specific synaptic sites by local bending or by adopting highly tortuous trajectories. Consequently, local density of synaptic contacts of these cortical axons seems quite low. However, principal claustral cells receive the majority of cortical input (Juraniec *et al.*, 1971; LeVay & Sherk, 1981; Hinova-Palova *et al.*, 2007), and are distributed throughout the length of the claustrum (LeVay, 1986; Reynhout & Baizer, 1999; Patzke *et al.*, 2014). Although synaptic connections between principal claustral neurons have been proposed to integrate cortical inputs in the claustrum (Crick & Koch, 2005; Smythies *et al.*, 2012; Druga, 2014; Smythies, 2014), recent evidence shows that synaptic contacts between these neurons are rare (Kim *et al.*, 2016). However, parvalbumin expressing claustral neurons also receive cortical input and are linked by electrical and chemical synapse supporting a longitudinal connectivity within the claustrum (Kim *et al.*, 2016). In view of the axonal morphologies shown here, one could expect that individual axons would weakly contact individual claustral neurons but potentially many neurons through the

length of the claustrum. The lengthy trajectories of these corticoclaustral axons could however, in conjunction with the intricate intraclaustral connectivity, affect wide territories therein.

Varicosities were observed along the axons as they travelled through the white matter of the external capsule. Axonal varicosities are indicative of synaptic contacts. There are few accounts of synaptic contacts within the white matter as there are few postsynaptic targets therein. Glutamate release along axons has previously been reported (Kriegler & Chiu, 1993; Li *et al.*, 1999). Moreover, synaptic contact with oligodendrocyte precursor cells have been shown along callosum and optic nerve axons in juvenile rats and ultrastructural evidence shows axonal swelling at the sites (Kukley *et al.*, 2007; Ziskin *et al.*, 2007). Also, glial cells in white matter express glutamate receptors (Fulton *et al.*, 1992; Káradóttir *et al.*, 2005). There is in adult rodents a low-density population of white matter neurons and the dendrites of some of these neurons extend within the white matter (Clancy *et al.*, 2001) and could be potential postsynaptic targets for the white matter varicosities of these axons. Transmitter release along axons could result in a spread of neuronal signals and increase the apparent connectivity of neural circuits (Kukley *et al.*, 2007), which could contribute to the claustrum's role in cortical synchronization.

In conclusion, we show here novel aspects of the cortical projection to the claustrum: i. Individual visual corticoclaustral axons form sensory modality specific longitudinal projection lines in the claustrum, ii. Some collaterals exit the sensory specific domains to travel through domains dedicated to other sensory modalities, iii. Some collaterals exit the claustrum to pursue their path in frontal cortices and striatum, iv. Varicosities are following a Poisson distribution and are very thin in diameter. These features contribute to our understanding of the internal structure of the claustrum and further emphasizes its high level of connectivity.

Conflict of interest

The author(s) confirm no conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article. We received no financial support for the authorship, and/or publication of this article.

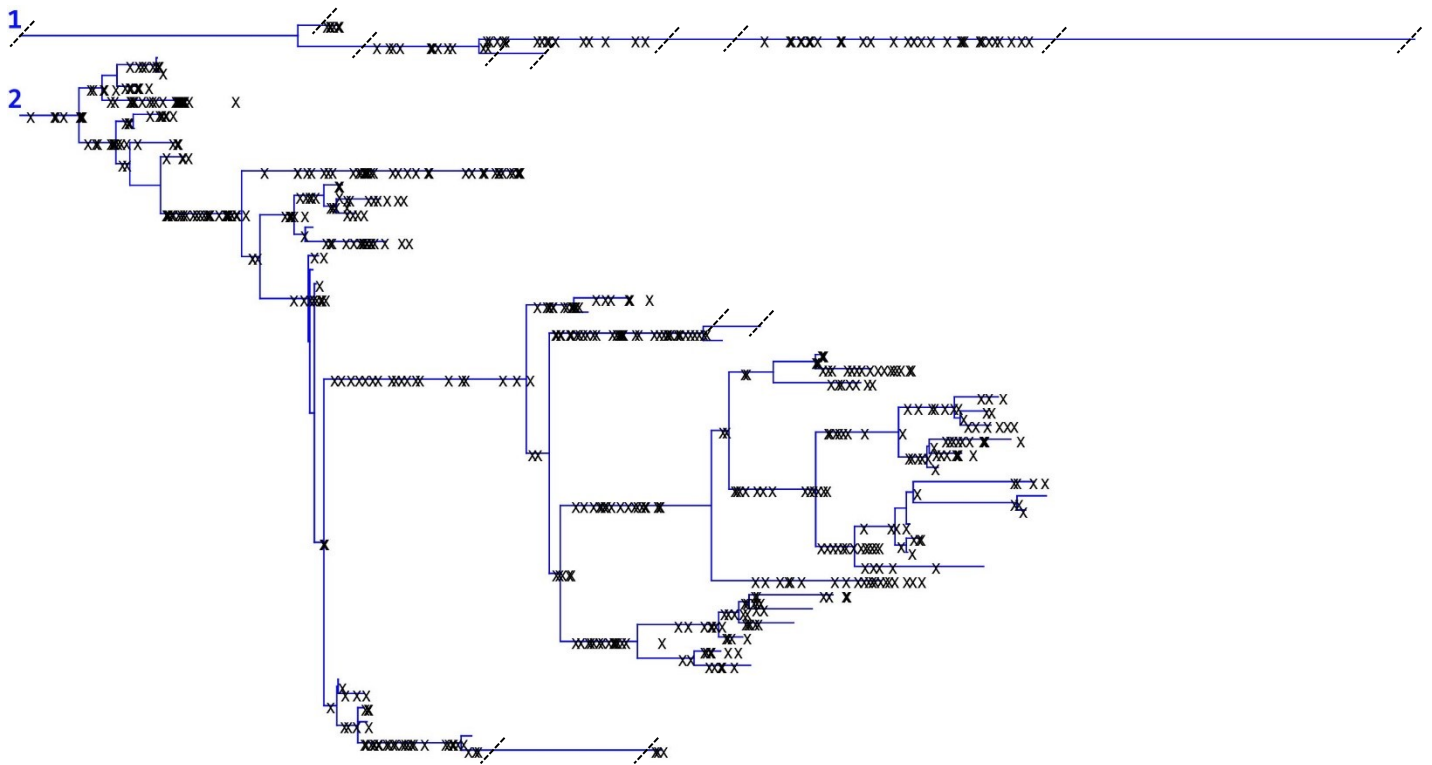
Chapitre 4 : Résultats supplémentaires

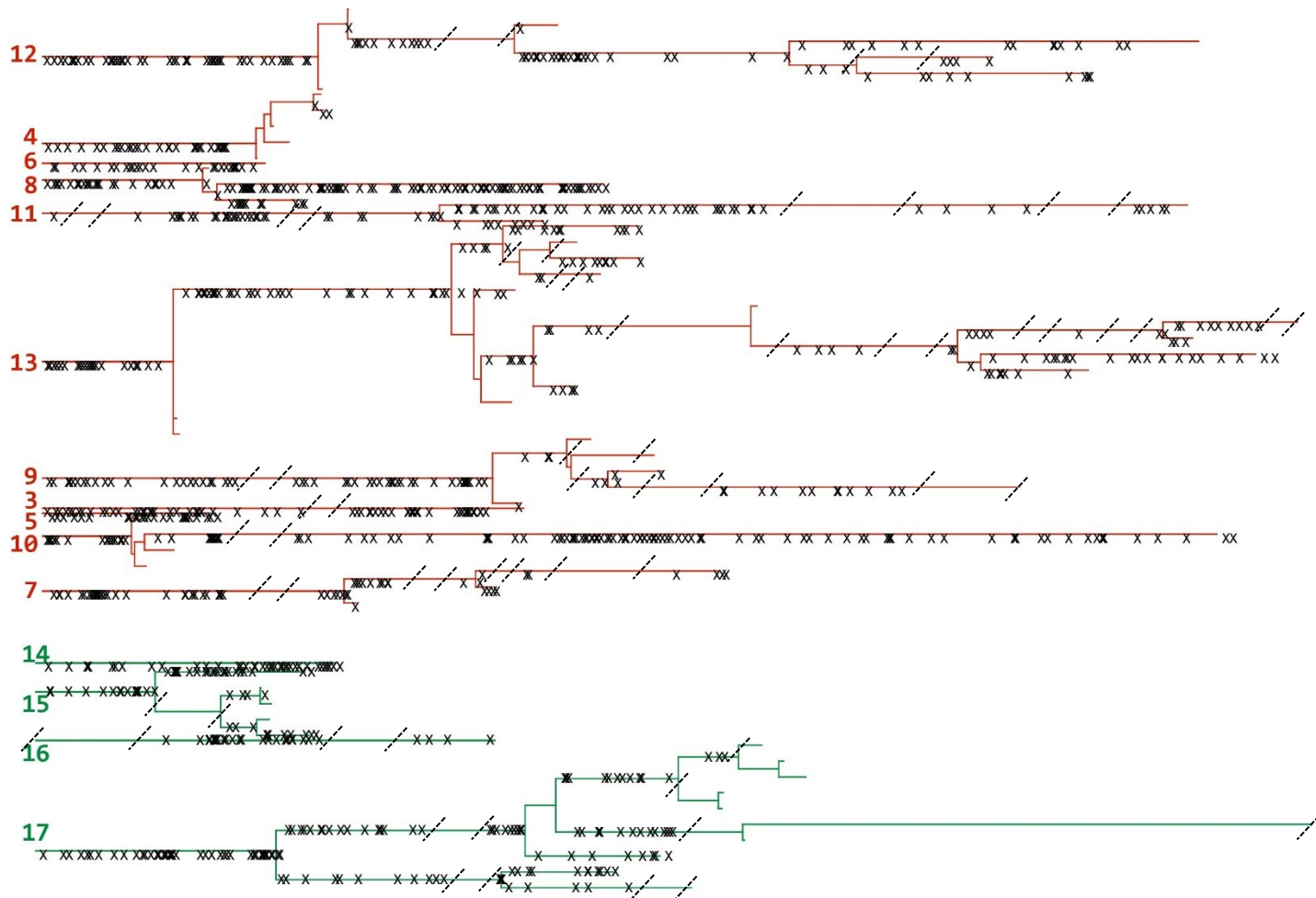
4.1 Dendrogrammes

Les dendrogrammes (fig. 24) représentent les axones disposés linéairement avec les collatérales et les arborisations représentées sous forme de schéma. Ce type de représentation permet de visualiser le nombre d'ordre de bifurcation et la distribution des varicosités sur les branches et par conséquent, où se situent les synapses potentielles.

Comme expliqué dans le chapitre 3, les axones sont parfois très longs, ramifiés et émettent beaucoup de collatérales, alors que d'autres sont beaucoup plus courts et ne se ramifient pas, créant ainsi des concentrations plus importantes d'axones dans les claustra. Il est donc difficile de visualiser la morphologie simple des axones s'ils ne sont pas montrés séparément. Les dendrogrammes ici permettent de bien voir quels axones sont fortement ramifiés et lesquels le sont moins. Par exemple, l'axone 2 (bleu) a 22 ordres de branchement. Les axones 13, 17, 20, 21 et 22 en ont respectivement 9, 7, 8, 11 et 12. Les axones du cas AD3 sont donc très ramifiés. Plusieurs axones sont complètement linéaires et ne se ramifient jamais, soient les axones 3, 5, 6, 14, 16 et 18. On voit aussi les axones qui sont très courts, tels les axones 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 18 et 19. Il est difficile de visualiser cette longueur avec un chiffre (comme celui donné dans le tableau 3 du chapitre 3), étant donné que le chiffre qui correspond à la longueur totale des axones considère aussi les branches collatérales. Si l'axone a beaucoup de collatérales, comme par exemple l'axone 21, ils ont l'air très longs (10 451 μm), mais sur le dendrogramme, on s'aperçoit qu'ils parcourent une distance plus courte que d'autres axones, tels les axones 1, 12, 11, 13, 10, 17, 22, qui ont une longueur pourtant moins élevée en chiffre.

Les dendrogrammes permettent également de visualiser la distribution des varicosités, qui ne sont pas représentées dans les reconstructions axonales (telles celles des figures 4 et 5 du chapitre 3). Avec ces dendrogrammes, on voit très bien la distribution des varicosités (X noirs) tout au long des axones, et nous sommes en mesure de visualiser qu'il n'y a pas d'agrégation particulière. La distribution linéaire aléatoire des varicosités suit distribution de Poisson. On remarque également que la distribution n'a pas de lien avec l'ordre des branches d'axones (par exemple, il n'y a pas plus de varicosités sur les branches terminales, ou vice-versa); elles sont vraiment distribuées aléatoirement sur toute la longueur des axones.





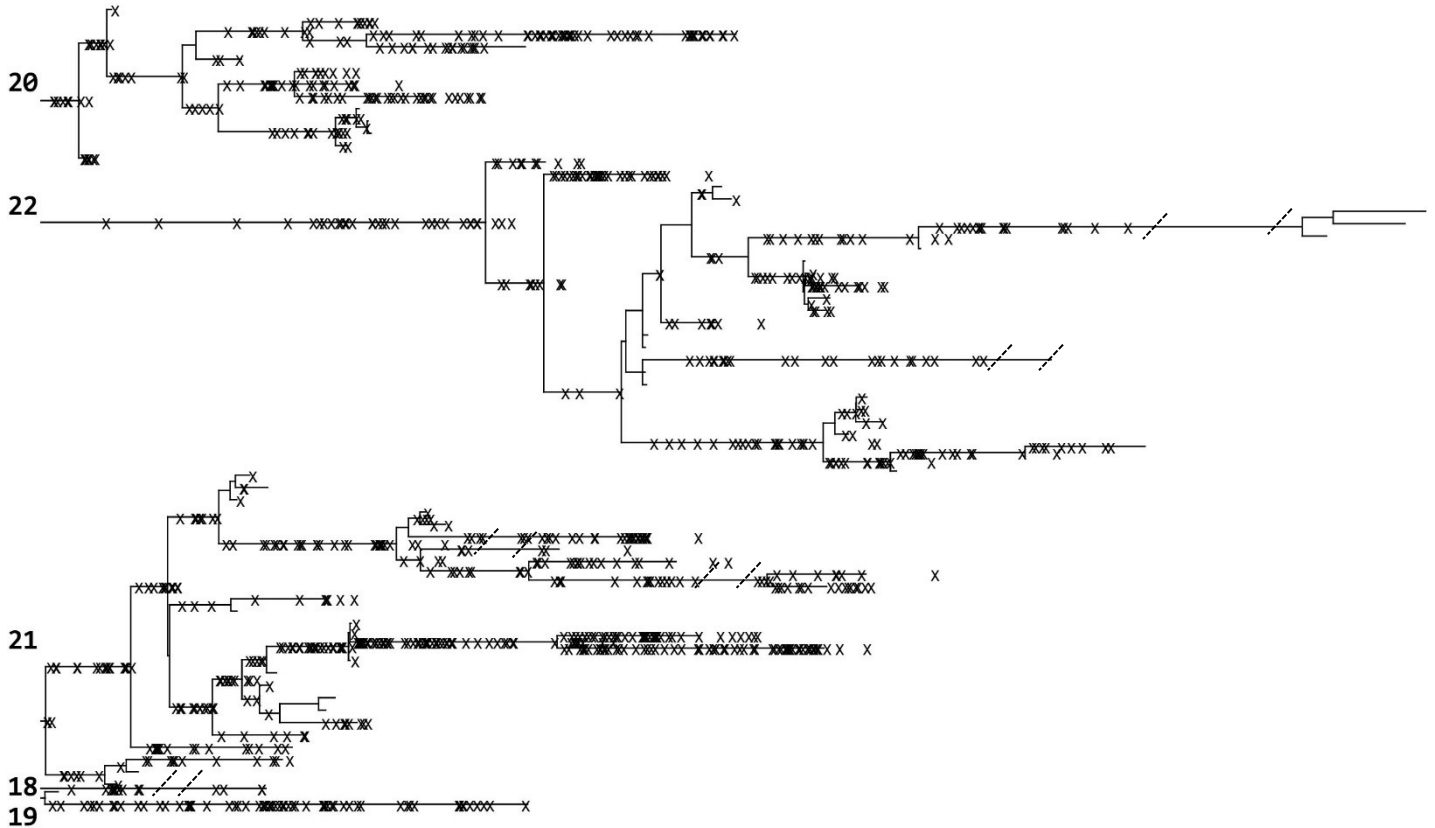


Figure 24. Dendrogrammes des 22 axones reconstruits. Les axones des claustra AC4 controlatéral (bleu), AC4 ipsilatéral (rouge), AD1 (vert) et AD3 (noir) sont représentés schématiquement par dendrogrammes. Les numéros des axones font référence au tableau 3 du chapitre 3. Les X noirs représentent l'emplacement des varicosités. Les lignes pointillées noires représentent les endroits où les axones ont été reconstruits à la main.

4.2 Autre axone et futur travail

Puisque les connexions les plus fortes vers le claustrum sont les projections des cortex frontaux, j'ai aussi tenté de faire des injections du traceur dans le cortex cingulaire et dans le cortex infralimbique. Puisque ces structures sont très près du sinus sagittal supérieur (2 mm de bregma en AV, moins de 1 mm en ML) (Paxinos & Franklin, 2008; Xiong *et al.*, 2017), la chirurgie est plus risquée, car si on accroche le sinus lors de la chirurgie, la souris peut faire une hémorragie grave et mourir. Pour éviter cela, il fallait injecter avec un angle de 30 degrés lors de la chirurgie stéréotaxique et descendre encore plus profondément (à plus de 2 mm), ce qui augmente la marge d'erreur pour atteindre la cible. De ce fait, l'injection est plus difficile à réaliser que dans le cortex visuel et j'ai souvent raté la cible (fig.25a). J'ai tout de même réussi à obtenir un animal avec une injection dans le cortex infralimbique qui déborde également dans le cortex prélimbique, ainsi que dans le cortex cingulaire dans les coupes plus postérieures du halo (fig.25b). Pour des futures analyses, d'autres injections seront faites et les souris injectées dans les cortex cingulaires, infralimbiques ou prélimbiques seront regroupées en « cortex frontaux ». Le but est de faire le même travail qui a été accompli pour le présent mémoire pour des axones du claustrum qui proviennent des cortex frontaux et de comparer ces projections avec les projections sensorielles.

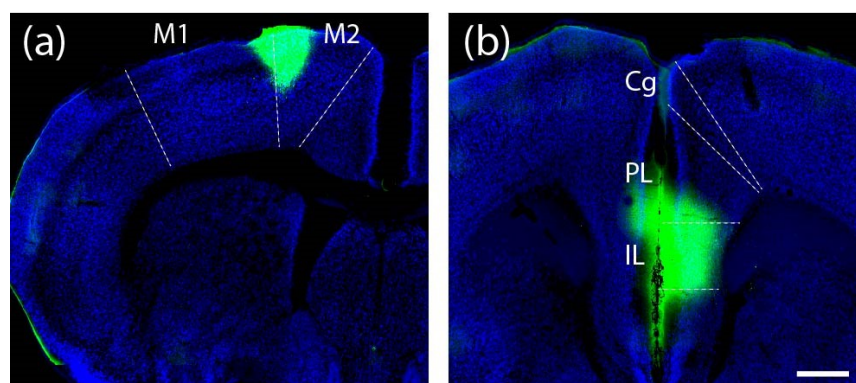
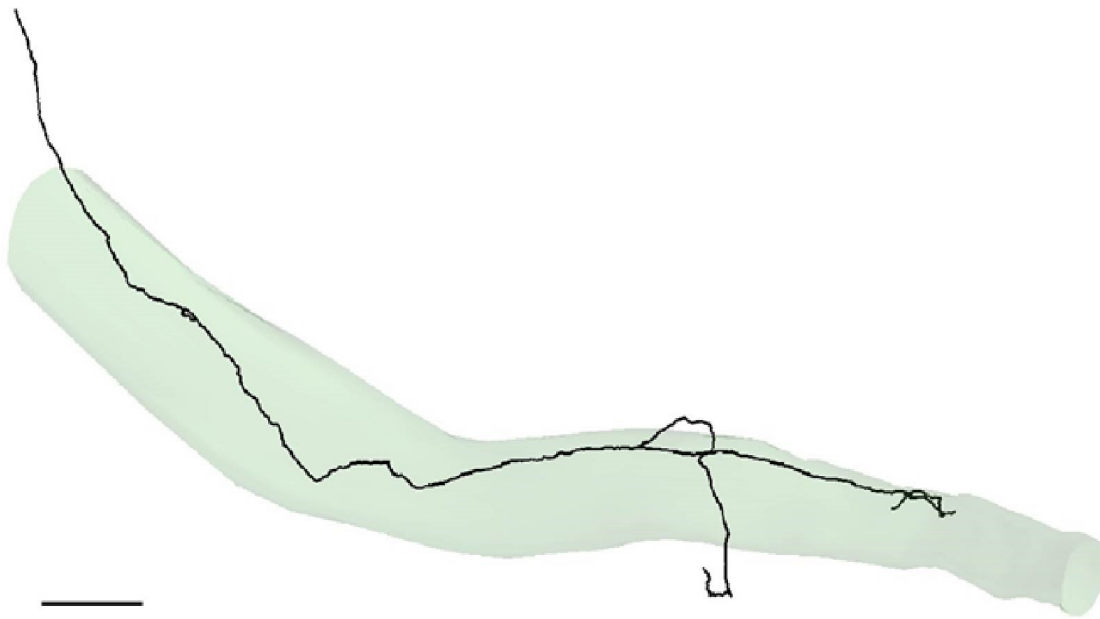


Figure 25. Sites d'injections de souris où la cible était les cortex frontaux pour des résultats supplémentaires. Ces photomicrographies à 10X montrent l'injection en vert (PHA-L) et en bleu, les corps neuronaux (NeuN). Les lignes blanches délimitent les aires corticales. En A (1,10mm de bregma), on observe le site d'injection dans le cortex moteur qui a raté la cible. En B (1,70 mm de bregma), on observe un animal qui a été conservé grâce à son injection dans le cortex infralimbique, qui déborde dans le cortex prélimbique et cingulaire. Échelle = 500 μ m.

Un axone du claustrum ipsilatéral a été reconstruit de l'animal qui a été injecté dans IL/Cg (fig. 26). Il n'a pas tout à fait la même trajectoire que les axones provenant du cortex visuel; il est plus court (longueur = 4364,28 μm), il entre dans le claustrum par son pôle rostral et se termine environ au 3/4 caudal du claustrum, il ne fait pas toute la longueur, comme d'autres axones du cortex visuel peuvent parcourir. De plus, il n'est pas beaucoup arborisé (5 ordres de branchement, voir dendrogramme de la figure 26b), et chemine dans tout l'axe dorso-ventral du claustrum; il ne se situe pas seulement dans l'axe central du claustrum. En effet, il change de trajectoire; il est situé au milieu du claustrum au début, remonte dans le haut de l'axe dorso-ventral, alors qu'une branche s'arborise vers le bas, sortant du claustrum. Son diamètre moyen est de 0,635 μm , ce qui n'est pas significativement différent des axones visuels ($p=0,182$). L'axone contient 78 varicosités, ce qui est proportionnellement acceptable par rapport aux autres axones (ex. l'axone 1 a 63 varicosités pour 4264,83 μm). Ses varicosités ont un diamètre moyen de 0,93 μm , ce qui n'est pas significativement différent des varicosités du cas AD1 ni de AD3 (respectivement, $p=0,791;0,730$), mais significativement différent des varicosités du cas AC4 (injection V2M) ($p<0,0001$), qui était déjà différent des cas des injectés en V1. Pour l'axone présenté dans la présente section, ses varicosités sont espacées en moyenne de 27,31 μm , avec un écart-type de 25,96 μm . Ces résultats suivent la loi de Poisson également (même presque parfaite, étant donné que les valeurs de la moyenne et de l'écart-type sont très près), comme les axones provenant du cortex visuel.

(a)



(b)



Figure 26. Résultats de la reconstruction tridimensionnelle d'un axone provenant des cortex frontaux cingulaires/infralimbique vert le claustrum ipsilatéral. Axone représenté dans le claustrum (contour vert) (A). Échelle = 250 μm . Axone représenté sous forme de dendrogramme (B). Les X noirs représentent les varicosités. Les lignes pointillées délimitent les endroits où les branches ont été reconstruites à la main et donc, où les varicosités n'ont pas été marquées.

Chapitre 5 : Discussion supplémentaire

5.1 Limites de l'étude

5.1.1 Le choix de l'espèce

Il est très pratique pour les chercheurs de travailler sur les souris, étant donné que l'on peut faire des expériences répétées sur un très grand nombre d'échantillons dans un espace limité et avec du matériel restreint. De plus, les souris sont dociles, donc facilement manipulables, et se reproduisent rapidement, ayant un temps de gestation de trois semaines (Masopust *et al.*, 2017; Sarkar & Heise, 2019). Elles comportent l'avantage d'être le mammifère le plus connu génétiquement, par ses mécanismes immunitaires, par son comportement, ainsi que son système nerveux central (Roubertoux, 1982). Le cortex du cerveau de souris devient mature après 8 semaines (54 jours) post-natal seulement, malgré d'autres changements qui continuent à apparaître dans le cerveau, comme dans la composition en myéline par exemple, jusqu'à 24 semaines (Hammelrath *et al.*, 2016). Notre centre d'intérêt étant le cortex, nous utilisons des souris âgées entre 60 et 90 jours, qui ont un volume cortical à maturité.

Même si les souris ne sont pas les mammifères les plus développés et avec le plus de structures définies dans le cerveau, l'inférence sur les primates peut se faire. Les souris sont comparables aux humains sous certains niveaux, comme par leur proximité génétique et leurs similarités au niveau cellulaire et structural du cerveau (Vanhooren & Libert, 2013; Miller *et al.*, 2014). En effet, comme elles ont été décrites dans les précédentes sections, grâce à plusieurs études, autant sur les rongeurs que sur l'humain ou les primates, et même dans des études comparatives entre les deux espèces, la connectivité et la morphologie du claustrum se ressemblent beaucoup entre le rongeur et le primate (Brand, 1981; Braak & Braak, 1982; Edelstein & Denaro, 2004; Crick & Koch, 2005; Buchanan & Johnson, 2011; Milardi *et al.*, 2013; Mathur, 2014; Torgerson *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018).

5.1.2 Le type de microscopie

Il était important pour moi d'être certaine que les images qui étaient générées à l'aide du microscope DSU allaient révéler tous les axones. J'ai donc pris des images à l'aide d'un microscope confocal laser (MCL) (Leica TCS SP8) pour vérifier et comparer avec les images DSU (fig.27), puisque c'est un microscope avec un peu plus de résolution (George, 2003; 2004). En effet, comme montré sur la figure ci-dessous, certaines petites branches étaient manquantes dans les images prises avec le DSU. Les axones étant très fins, ils se situent sous la résolution maximale des disques, mais ils sont apparents grâce aux lasers du MCL; ils sont toutefois eux aussi à la limite de la résolution. J'ai cependant décidé de continuer de fonctionner avec les images du DSU pour plusieurs raisons.

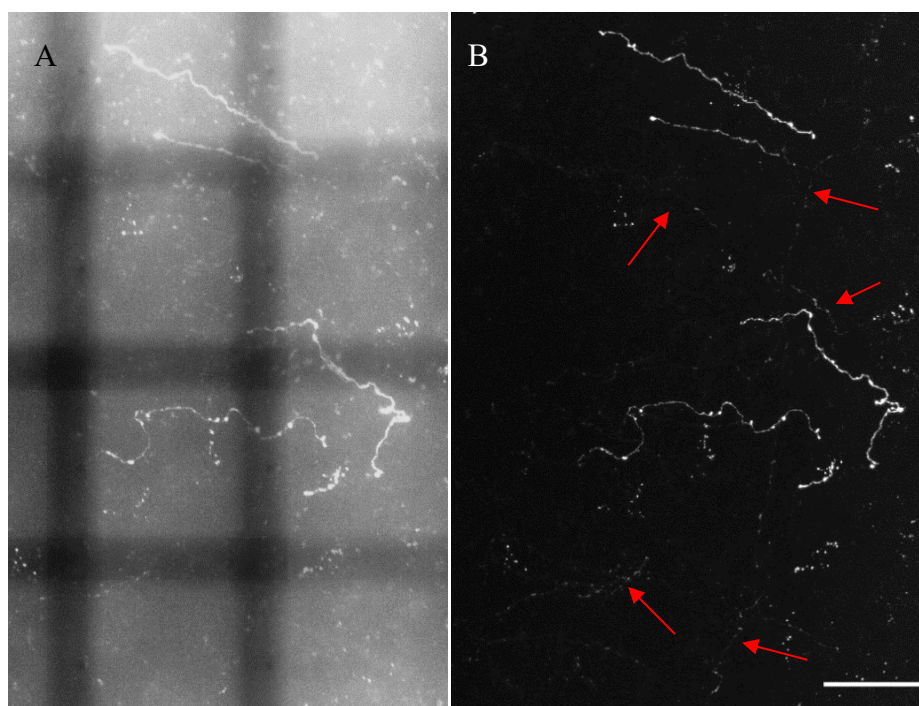


Figure 27. Photographie à partir du microscope spinning disk DSU (A) versus à partir du microscope laser confocal (B). Les flèches en rouge de B indiquent certaines branches qui ne sont pas visibles en A. Échelle = 25 μ m.

Premièrement, les axones qui sont visualisés avec le DSU étaient aussi détectés au MCL. Nous étions donc assurés que la structure de base des axones était bien valide, même avec le microscope DSU. Deuxièmement, les petites branches manquantes en DSU, mais qui sont détectées très faiblement par le MCL sont très fines et elles auraient donc trop souvent été impossibles à suivre d'une coupe à l'autre, et donc, impossibles à reconstruire entièrement.

Troisièmement, le microscope confocal laser à ma disposition n'est pas relié au logiciel Neurolucida. Le microscope DSU et sa plateforme motorisée sont contrôlés par ce logiciel. Celui-ci permet l'alignement des nombreuses coupes parcourues par les axones reconstruits. De ces faits, le choix de la microscopie DSU a été conservé.

5.1.3 Le choix du traceur

Les avantages d'utilisation de la leucoagglutinine de fève rouge *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) comme traceur ont été expliqués dans la section 2.2.1; ce sont les raisons pour lesquelles il a été choisi. Cependant, il aurait été possible de choisir d'autres techniques, mais voilà pourquoi elles ont été rejetées favorablement au PHA-L.

Une technique qui a beaucoup été utilisée dans les années 2000 est le traçage par des amines de dextran biotinylées (BDA). Cette technique permet un marquage antérograde avec une grande sensibilité des axones (Reiner *et al.*, 2000). Il comporte cependant plusieurs désavantages à la présente étude. Premièrement, puisque c'est la partie extracellulaire des axones qui est marquée par le BDA, par des injections assez larges, les parties distales des axones sont analysables, mais les autres parties le sont plus difficilement (Rockland, 2016a). Deuxièmement, il est moins spécifique que le PHA-L, étant donné qu'il fait aussi du marquage rétrograde (Zhang *et al.*, 2017). Le marquage rétrograde est indésirable dans la présente étude, étant donné que l'on ne veut pas marquer les axones du claustrum vers le cortex, mais plutôt les axones cortico-claustraux. Finalement, la BDA ne fluoresce pas et cette technique n'est donc pas en accord avec notre type de microscopie.

Des vecteurs viraux qui produisent un marquage antérograde d'axones tels certains adénovirus associés (AAV) qui induisent la production de protéines fluorescentes permettent un traçage antérograde sélectif et spécifique comparable au PHA-L (Oh *et al.*, 2014). Ces techniques virales ont été considérées pour le présent projet et il était même question de faire des injections d'un semblable virus AAV pour visualiser les axones du claustrum, qui auraient peut-être permis un marquage plus précis des petites collatérales (Beier, 2016). Cependant, à cause des coûts beaucoup plus élevés et des techniques d'injection qui nécessitent un laboratoire de sécurité niveau 2, qui n'était pas disponible au début de ce projet, l'idée d'utiliser du PHA-L a été conservée. Cette technique est cependant à considérer pour les études futures.

En bref, le PHA-L était le marqueur idéal pour visualiser les axones des projections du cortex visuel vers le claustrum de la souris, étant donné qu'il s'agit d'un marqueur spécifique, antérograde et permet de bien visualiser les axones et leurs terminaisons. Cela remplissait les exigences de l'étude, et les autres techniques comportaient des désavantages. Elles seront cependant à considérer pour des études ultérieures.

5.2 La reconstruction d'axones et ses technologies

5.2.1 Pourquoi reconstruire des axones ?

Il faut accorder de l'importance aux études d'axones uniques, puisque celles-ci comportent les informations structurelles de base des structures du cerveau, qui permettront éventuellement de mieux comprendre l'organisation intrinsèque de ces structures, les relations entre elles et par le fait même, leurs fonctions (Bevan *et al.*, 1997; Bohland *et al.*, 2009; Economo *et al.*, 2016; Parent, 2016b). Plus spécifiquement, les axones uniques nous informent sur l'organisation fine des connexions par des aspects quantitatifs comme le nombre, la grosseur, la trajectoire, la carte synaptique (par les varicosités) et la myélinisation des arborisations (Rockland, 2002; 2020). Ces paramètres morphométriques informent sur l'excitabilité, la vitesse de conduction et la physiologie de la propagation du signal d'échange entre les structures que ces arborisations contactent (Debanne, 2004; Debanne *et al.*, 2011; Seidl & Rubel, 2016; Rama *et al.*, 2018; Rockland, 2018). Les paramètres physiologiques des connexions d'une structure informent sur la fonction de celle-ci grâce aux interactions avec les autres structures du cerveau (Crick & Koch, 2005; Sporns *et al.*, 2005).

Puisque les fonctions du claustrum ne sont pas encore déterminées complètement par la communauté scientifique à ce jour, les études d'axones uniques du claustrum sont primordiales; la connaissance détaillée des circuits neuronaux est essentielle à la compréhension des fonctions du claustrum (Crick & Koch, 2005). Cependant, il s'agit de la première étude de reconstruction tridimensionnelle d'axones individuels du claustrum. Non seulement il n'y a pas d'études d'axones uniques corticaux vers le claustrum, mais il n'y a pas non plus d'études provenant d'autres aires du cerveau vers le claustrum. La littérature est complètement privée des informations importantes structurelles de base du claustrum; seules des études de marquage de masse sont disponibles pour avoir une idée de la connectivité du claustrum dans le cerveau de souris (Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zingg *et al.*, 2018). Les seules informations disponibles à l'échelle de la microcircuiterie qui existe entre le cortex et le claustrum proviennent de banques de reconstructions d'axones de masse, comme le NeuronBrowser du Mouselight de Janelia Research Campus, mais qui ne fournissent pas les paramètres morphométriques importants décrits plus haut (Winnubst *et al.*, 2019). Cette banque offre 37

axones reconstruits dans le claustrum, mais aucun en provenance des cortex sensoriels. Une autre banque bien connue est le NeuroMorpho qui contient 141 887 neurones reconstruits, mais aucun du claustrum (Parekh & Ascoli, 2015). Il est certain que la technique de marquage utilisée dans le présent projet est efficace pour cartographier les axones (Rockland, 2016a), mais elle est laborieuse et très longue. Cela limite ainsi la taille des échantillons et donc d'inférer complètement sur la microcircuiterie complète et c'est pourquoi les banques d'axones utilisent d'autres techniques plus avantageuses au point de vue du rendement (Winnubst *et al.*, 2019).

5.2.2 Les méthodes technologiques de reconstructions d'axones

Il y a plusieurs études d'axones uniques qui utilisent des techniques de reconstructions manuelles laborieuses comme la nôtre. Cependant, certaines avancées technologiques d'imagerie permettent d'augmenter le rendement de l'échantillonnage des axones et l'efficacité d'automatisation des tâches de reconstruction (Beier, 2016).

Une nouvelle technique histologique qui est également utilisée pour la reconstruction massive d'axones est nommée CLARITY. Elle permet une imagerie par fluorescence dans des blocs de tissus intacts, parce que ces blocs sont clarifiés en retirant les lipides qui bloquent la visualisation des tissus, ce qui permet la visualisation des axones à travers des millimètres de tissus (Chung *et al.*, 2013). Une autre méthode appelée iDISCO (Renier *et al.*, 2014) montre des résultats semblables. Ces tissus sont ensuite observés par une nouvelle technologie d'imagerie, appelée le « light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) » permettant de visualiser ces cerveaux, en d'autres mots, rendus transparents (Corsetti *et al.*, 2019). Cette technique est avantageuse pour la reconstruction d'axones, étant donné que les tissus ne sont pas coupés et donc, les axones peuvent être reconstruits sans avoir à aligner des coupes, qui peuvent en plus avoir subies des distorsions (Beier, 2016). Cependant, la résolution n'est pas assez forte pour marquer les collatérales terminales des axones, ni les paramètres morphologiques importants comme les boutons ou les varicosités.

Une autre nouvelle technique utilisée pour la reconstruction d'axones est appelée « fluorescence micro-optical sectioning tomography (fMOST) ». Cette technique permet une très grande résolution et une reconstruction automatique d'axones dans le cerveau (Gong *et al.*, 2013). En effet, fMOST produit des images du cerveau entier avec une résolution de voxel d'un

micron. Les projections neuronales et les axones qui parcourent de très longues distances peuvent donc être systématiquement et automatiquement reconstruits sans interruption (Gong *et al.*, 2013). Cette technique est entre autres utilisée dans le Allen Brain Connectivity Project (Oh *et al.*, 2014). Le désavantage de cette technique, contrairement aux reconstructions manuelles plus laborieuses comme la présente étude, est qu'encore une fois, avec une résolution d'un micron, ces études ne montrent pas de boutons ou de varicosités.

La technologie tomographique à 2-photons permet d'imager le cerveau complet avec une forte résolution de moins d'un micromètre et ainsi tracer les axones (Economo *et al.*, 2016). Cette résolution est supérieure aux deux dernières techniques mentionnées. Elle comporte également l'avantage de prendre une image à chaque coupe de tissu effectuée, diminuant ainsi les erreurs de distorsions des coupes dans l'alignement et la reconstruction des axones (Economo *et al.*, 2016). C'est cette technique qui est utilisée dans la banque d'axones du Mouselight de Janelia Research Campus, qui ont reconstruit 1000 axones avec une technique semi-automatique (algorithmes) de reconstruction (Winnubst *et al.*, 2019). Par contre, cette technique est malheureusement trop dispendieuse et trop lourde pour de petits laboratoires. Notre technique est tout de même favorable à la leur, car tel qu'expliqué précédemment, leur méthode ne montre pas les varicosités (Winnubst *et al.*, 2019). Des exemples des axones reconstruits dans le NeuronBrowser du Mouselight se trouvent dans la figure 28; tel qu'expliqué dans la dernière section, c'est d'ailleurs la seule information sur des axones uniques du claustrum disponible dans la littérature.

Une autre technologie tomographique se fait avec la microscopie électronique et permet une reconstruction des structures observées dans 1 mm³ de tissus avec la meilleure résolution qui existe à ce jour (Hua *et al.*, 2015). Malgré l'immensité des détails et de la précision de reconstruction que permet cette résolution, cette technique ne peut fonctionner pour la reconstruction d'axones de longues distances, étant donné que la technique de reconstruction est très longue; elle est donc livrée aux reconstructions locales (Berning *et al.*, 2015; Shibata *et al.*, 2015; Wanner *et al.*, 2015).

Également, une nouvelle technique à la fine pointe de la technologie, appelée Multiplexed Analysis of Projections by Sequencing (MAPseq) se base sur le séquençage d'ARN et des codes génétiques de neurones infectés par des vecteurs viraux pour connaître

l'emplacement des axones dans différentes régions du cerveau (Yonehara & Roska, 2016; Han *et al.*, 2018). En effet, l'injection d'un vecteur viral, qui contient une séquence d'ARN spécifique, dans différentes régions du cerveau, infectera les neurones de cette région et ces neurones contiendront la séquence d'ARN. Par la suite, il faut faire l'extraction de tissus de différentes aires du cerveau et le séquençage de l'ARN; si on reconnaît la séquence d'ARN de départ, on comprend qu'une partie de l'axone du neurone injecté est présent à cet endroit spécifique du cerveau (Kebschull *et al.*, 2016). Cette technique permet donc de savoir où les neurones se dirigent, mais ne permettent pas de visualiser les axones et donc, pas de les reconstruire; elle serait très avantageuse pour pouvoir savoir où se dirigent les axones. Cependant, encore une fois, cette technique informe sur le connectome, mais pas sur la morphologie détaillée des axones, en plus d'être très coûteuse et de nécessiter des appareils et instruments qui ne sont pas à la portée de tous.

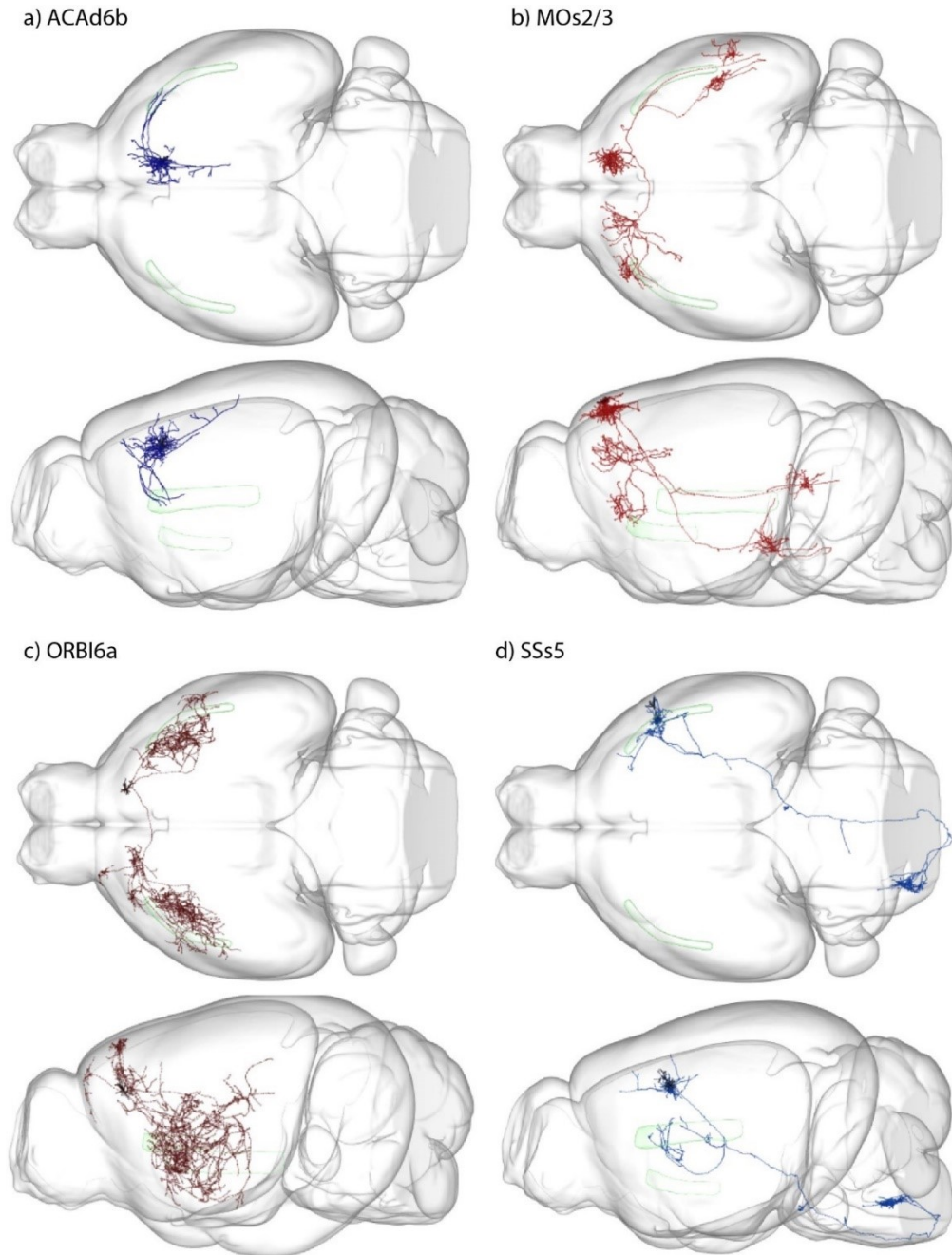


Figure 28. Quatre exemples des 37 axones listés dans le NeuronBrowser du Mouselight de Janelia Research Campus. Les critères de recherche des axones étaient les suivants : 1-corps cellulaire dans le cortex et 2-termination axonale dans le claustrum. On peut voir les axones sous deux angles différents, soit vu du dessous du cerveau ou vu sur le côté. Le claustrum est représenté par le contour vert pâle et le cerveau par le masque gris. Exemple des 4 axones répertoriés qui viennent du cortex cingulaire antérieur (A). Exemple des 31 axones qui viennent du cortex moteur (B). On voit aussi le seul exemple répertorié d'axone provenant du cortex orbital (C) et du cortex somatosensoriel (D).

5.3 La connectivité du claustrum

Certains axones cortico-claustraux sont linéaires et parcourent toute la longueur du claustrum alors que d'autres ont des ramifications qui semblent s'étendre au-delà du domaine visuel du claustrum (lignes bleues, fig. 29). De petites varicosités (points magenta, fig. 29) sont présentes sur toute la longueur des axones, distribuées de manière aléatoire. Ces varicosités représentent des endroits où il y a des synapses dans les axones (Hellwig *et al.*, 1994). Puisque les axones sont très fins (Debanne, 2004; Debanne *et al.*, 2011; Rama *et al.*, 2018; Rockland, 2018), que les varicosités sont très petites également (Petrof & Sherman, 2013), les axones qui entrent dans le claustrum en provenance de modalités sensorielles ne se dépolarisent probablement pas fortement. Par contre, la connectivité interne du claustrum (interneurones PV+ et cellules ClaC) fait en sorte que l'information corticale peut se propager dans le claustrum, par les connexions dendro-dendritiques entre les cellules PV+ (Kim *et al.*, 2016) (voir schéma fig. 29). La connectivité interne du claustrum, ainsi que le fait que les axones bifurquent parfois dans d'autres modalités sensorielles du claustrum, permettent ensemble de supposer qu'il y aurait une connectivité entre les modalités sensorielles dans le claustrum. Cela pourrait en effet supporter l'hypothèse que le claustrum jouerait un rôle d'intégration multisensorielle (Crick & Koch, 2005).

Lors de la reconstruction des axones vers le site d'injection, on retrouve également des varicosités, même lorsque l'axone remonte par la matière blanche de la capsule externe. Il y aurait donc alors des contacts synaptiques même dans leur passage dans la matière blanche, chose qui est très peu connue (Kukley *et al.*, 2007; Ziskin *et al.*, 2007). En passant par la matière blanche avant d'entrer dans le claustrum, les axones pourraient contacter des neurones interconnectés, avec d'autres fonctionnalités. Certains neurones du claustrum projettent au striatum, alors que des neurones de la matière blanche projettent également à celui-ci. De ce fait, le claustrum serait indirectement connecté avec des neurones de la matière blanche (von Engelhardt *et al.*, 2011; Frazer *et al.*, 2017; Borra *et al.*, 2020).

De plus, les axones reconstruits montrent certaines bifurcations dans des cortex extrastriés avant de poursuivre leur trajectoire dans le claustrum. Ces multiples connexions, soit par le biais de la matière blanche ou par le biais des bifurcations dans d'autres cortex, pourraient

permettre de faire un lien avec le fait que le claustrum jouerait un rôle de synchronisation et d'amplification corticale (Smythies *et al.*, 2012). Ce rôle nécessite des connexions cortico-claustrales qui communiquent avec des projections cortico-claustrales, qui pourraient provenir de la matière blanche ou des bifurcations dans les cortex extrastriés. Ce rôle serait également soutenu par la connectivité intra-claustrale du claustrum, expliquée précédemment; si toutes les cellules claustrales communiquent sur la longueur du claustrum, en provenance d'un signal cortico-claustral, le claustrum pourrait se synchroniser lui-même à la fréquence recherchée pour aider à amplifier et synchroniser ce signal (Smythies *et al.*, 2012).

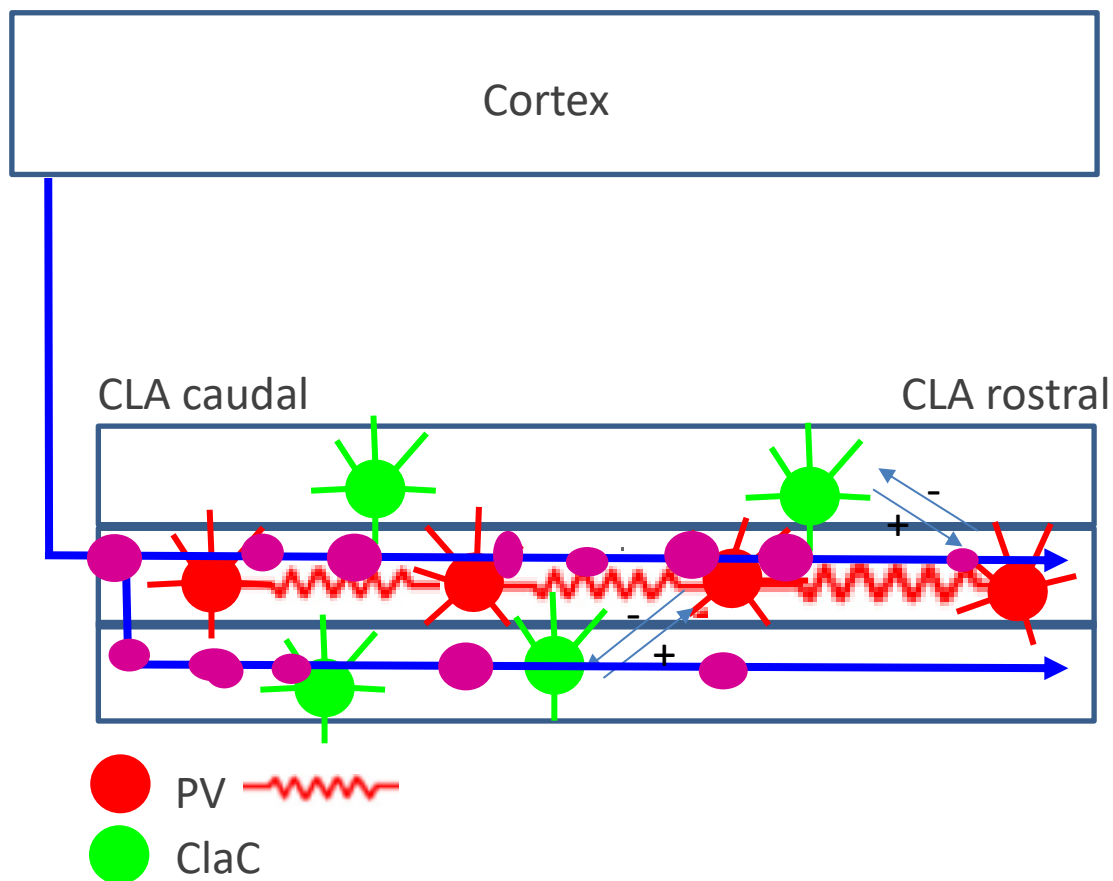


Figure 29. Schéma de connectivité intraclaustrale et la distribution des axones du cortex dans le claustrum. Les cellules rouges représentent les cellules PV+ qui émettent des connexions entre elles (dessins de résistance rouge) et les vertes représentent les cellules principales du claustrum (qui émettent des connexions avec les cellules PV+ montrées par les flèches). Un axone est schématisé en bleu, avec des varicosités en rose.

5.4 Futur travail

5.4.1 Importance des projections frontales

Selon les travaux de Wang et al (2017) et de Atlan et al (2017) et de plusieurs autres études, les connexions les plus fortes vers le claustrum sont les projections qui viennent des cortex frontaux (Smith & Alloway, 2010; Druga, 2014; Smythies, 2014; Torgerson & Van Horn, 2014; Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Qadir *et al.*, 2018; Zingg *et al.*, 2018). Les cortex frontaux incluent les cortex prélimbiques, infralimbiques, orbitaux et cingulaires. Ces projections chevaucheraient tout l'axe dorso-ventral du claustrum (Atlan *et al.*, 2017), en plus d'être denses, bilatérales et réciproques (Wang *et al.*, 2017). Cette tendance a été montrée dans ces études qui utilisent du bulk labeling, mais n'a jamais été étudiée à l'échelle d'axones uniques. Ces projections étant très fortes vers le claustrum, visualiser les axones uniques serait important pour déterminer la connectivité générale du claustrum et mieux comprendre sa séparation dorso-ventrale par la trajectoire des axones.

Ces résultats pourraient permettre également, grâce à la morphologie des connexions entre le claustrum et les cortex frontaux, d'appuyer les différentes études sur les fonctions du claustrum en lien avec ces cortex. Par exemple, si les axones frontaux du claustrum chevauchent vraiment tout l'axe dorso-ventral du claustrum, ces connexions seraient en mesure d'influencer toutes les modalités sensorielles simultanément. Cela serait en accord avec l'hypothèse comme quoi les connexions préfrontales vers le claustrum modulent l'attention par une stratégie d'orientation de tâche et supporte la résilience aux distractions en définissant un focus attentionnel (Goll *et al.*, 2015; Atlan *et al.*, 2017; Atlan *et al.*, 2018). En effet, il pourrait désigner quelles modalités sont stimulées plus fortement, ou au contraire, qui sont moins importantes à ce moment-là, simultanément. De plus, la reconstruction des axones du claustrum en provenance des cortex frontaux pourrait permettre de supporter les hypothèses comme quoi le claustrum jouerait un rôle dans le contrôle cognitif par ses connexions avec les cortex cingulaire et préfrontal (White & Mathur, 2018; Krimmel *et al.*, 2019). Par le fait même, les résultats morphologiques et cartographiques d'une étude ultérieure d'axones uniques pourraient aussi permettre de confirmer ou de rejeter les hypothèses fonctionnelles reliées à l'interaction entre les cortex préfrontaux et le claustrum, soient de la mémoire (Jones & Wilson, 2005; Kitanishi

& Matsuo, 2017; Qadir & Mathur, 2019), des émotions (Pathak, 2014; Jackson *et al.*, 2020), etc.

Il serait donc très intéressant de faire le même travail que le présent projet du mémoire, mais en reconstruisant les axones qui proviennent des cortex frontaux. Un exemple est présenté dans la section 4.3, qui permet de voir des résultats préliminaires sur la morphologie des axones du cortex cingulaire et infralimbique. Cela est cependant très insuffisant et il faudrait effectuer des études comparatives entre plusieurs projections cortico-claustrales et augmenter le nombre d'échantillon d'axones reconstruits en provenance de ces cortex.

5.4.2 Hypothèses

Premièrement, on devrait s'attendre à des axones marqués dans les deux claustra (dans les deux hémisphères), en accord avec les études précédentes (Atlan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Deuxièmement, on s'attendrait à des axones qui ne traversent pas nécessairement toute la longueur du claustrum, étant donné que les projections frontales semblent projeter au claustrum plus rostral, de manière topographique (Edelstein & Denaro, 2004). On pourrait troisièmement s'attendre à des axones très ramifiés, permettant de chevaucher toutes les modalités sensorielles des différents segments longitudinaux de l'axe dorso-ventral du claustrum, ou alors à plusieurs axones qui auraient des trajectoires différentes, couvrant l'ensemble de l'axe dorso-ventral également (Atlan *et al.*, 2017). Quatrièmement, on s'attend à ce que le nombre de varicosités soit plus élevé proportionnellement à la longueur de l'axone que pour les projections visuelles. Il doit probablement y avoir beaucoup de synapses, et donc, beaucoup de varicosités (les synapses sont dans les renflements des axones, les varicosités) (Vrensen & De Groot, 1975; Blue & Parnavelas, 1983; Hellwig *et al.*, 1994), pour permettre une meilleure communication entre les cortex frontaux et le claustrum, étant donné que les projections sont plus denses (et donc plus fortes).

Conclusion

Le claustrum était autrefois une structure bien incomprise du cerveau; l'étudier était très difficile en raison des technologies peu développées pour effectuer des injections ou pour enregistrer son activité. Par contre, plus les années ont avancé, plus la technologie s'est développée et plus l'intérêt des chercheurs pour comprendre cette structure s'est manifesté. Le claustrum est une très petite structure sous-corticale aplatie, située entre le cortex insulaire et le striatum, plus précisément séparé par les capsules extrêmes et externes, et qui parcourt toute la longueur rostro-caudale du striatum. C'est la structure la plus interconnectée par unité de volume du cerveau; il reçoit énormément de connexions du cortex, réciproques et bilatérales, en plus d'avec plusieurs régions sous-corticales. Il a une connectivité intrinsèque bien définie, grâce à ses deux principaux types de cellules, les cellules glutamatergiques excitatrices ClaC, ainsi que les interneurons inhibiteurs parvalbumin, qui créent une boucle d'inhibition avec le cortex. D'ailleurs, cette connectivité interne et l'interaction avec le cortex permettent de poser une hypothèse fonctionnelle sur le claustrum dans la synchronisation et l'amplification d'oscillations corticales. Ce sont les hypothèses fonctionnelles du claustrum qui ont fait renaître les recherches sur celui-ci, surtout après l'arrivée de l'hypothèse qu'il jouerait un rôle dans la conscience. On sait maintenant qu'il a une fonction dans le soutien de l'attention, chose qui se doit d'être investiguée encore. Le but de l'étude était justement d'approfondir les connaissances fondamentales sur l'anatomie de la connectivité du claustrum, pour pouvoir éventuellement répondre à ces hypothèses. L'étude d'axones uniques procure des informations de bases, mais primordiales à la compréhension de la structure.

Les axones observés provenant du cortex visuel de la souris vers le claustrum sont généralement très petits en diamètres, non myélinisés et parcourent toute la longueur du claustrum dans le milieu de son axe dorso-ventral, tout en bifurquant dans les autres modalités sensorielles. Ils disposent également de varicosités sur toute leur longueur, distribuées de manière aléatoire et qui sont également très petites. La morphologie des axones reconstruits dans ce projet offre des informations pertinentes sur la distribution spatiale des axones sensoriels, qui sont en concordance avec les hypothèses fonctionnelles décrites précédemment. Par exemple, c'est en accord avec l'hypothèse que le claustrum joue un rôle dans l'intégration

multimodale, et par le fait même, l'attention, par le fait que les axones visuels bifurquent dans d'autres modalités sensorielles du claustrum décrites par Atlan. Également, le fait que des varicosités soient disposées tout au long des axones aléatoirement est en accord avec l'hypothèse de synchronisation corticale, grâce à la connectivité longitudinale avec les cellules du claustrum.

Comme mentionné dans la section 5.4, il est également important de poursuivre les recherches pour observer les projections d'autres cortex vers le claustrum, en particulier les projections qui sont plus fortes vers celui-ci, puisque cela nous informera plus sur sa grande connectivité. Le présent projet ainsi que les futures études apporteront un avancement des connaissances importants pour les neuro-anatomistes, par le biais de deux volets importants de l'étude. Effectivement, ce mémoire contribue au développement de connaissances nouvelles sur la connectivité du claustrum. En effet, la reconstruction d'axones individuels montre comment l'information d'un seul neurone cortical est distribuée à l'intérieur du claustrum. L'étude contribuera à mieux connaître la structure du claustrum et des circuits corticaux et sous-corticaux qui sont directement en lien avec les mécanismes fondamentaux de l'attention, ce qui n'est pas très bien connu à ce jour. Également, comme mentionné précédemment, les études d'axones uniques permettent de comprendre la microcircuiterie fine d'une structure; il n'y a présentement pas d'études qui documentent la structure et les varicosités des axones uniques du claustrum, c'est une première, malgré que l'on doive investiguer davantage la structure des projections d'autres cortex sensoriels et frontaux. La présente étude ajoutera un élément de base important à la littérature et aux connaissances sur cette structure fort intéressante, mais négligée, en recherche sur le cerveau.

Références bibliographiques

- Akagi, T., Ishida, K., Tohno, H. & Hanasaka, T. (2008) Preservation of ultrastructure and immunoreactivity in cryosections of brain tissue stored in a sucrose-gelatin solution at freezing temperatures. *J Microsc*, **231**, 21-27.
- Amir, Y., Harel, M. & Malach, R. (1993) Cortical hierarchy reflected in the organization of intrinsic connections in macaque monkey visual cortex. *J Comp Neurol*, **334**, 19-46.
- Aransay, A., Rodríguez-López, C., García-Amado, M., Clascá, F. & Prensa, L. (2015) Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front Neuroanat*, **9**, 59-83.
- Arnold, F. (1838) Tabulae anatomicae: quas ad naturam accurate descriptas in lucem edidit (Band 1): Icones cerebri et medullae spinalis: decem tabulae elaboratae et totidem adumbratae. In Fuesslin, O. (ed), Zürich, pp. 25.
- Arnow, B.A., Desmond, J.E., Banner, L.L., Glover, G.H., Solomon, A., Polan, M.L., Lue, T.F. & Atlas, S.W. (2002) Brain activation and sexual arousal in healthy, heterosexual males. *Brain*, **125**, 1014-1023.
- Aston-Jones, G. & Cohen, J.D. (2005) An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 403-450.
- Atlan, G., Terem, A., Peretz-Rivlin, N., Groysman, M. & Citri, A. (2017) Mapping synaptic cortico-claustral connectivity in the mouse. *J Comp Neurol*, **525**, 1381-1402.
- Atlan, G., Terem, A., Peretz-Rivlin, N., Sehrawat, K., Gonzales, B.J., Pozner, G., Tasaka, G.I., Goll, Y., Refaeli, R., Zviran, O., Lim, B.K., Groysman, M., Goshen, I., Mizrahi, A., Nelken, I. & Citri, A. (2018) The claustrum supports resilience to distraction. *Curr Biol*, **28**, 2752-2762 e2757.
- Baizer, J.S. (2001) Serotonergic innervation of the primate claustrum. *Brain Res Bull*, **55**, 431-434.
- Baizer, J.S., Sherwood, C.C., Noonan, M. & Hof, P.R. (2014) Comparative organization of the claustrum: what does structure tell us about function? *Front Syst Neurosci*, **8**, 117-127.
- Banati, R.B., Goerres, G.W., Tjoa, C., Aggleton, J.P. & Grasby, P. (2000) The functional anatomy of visual-tactile integration in man: a study using positron emission tomography. *Neuropsychologia*, **38**, 115-124.

- Bartos, M., Vida, I. & Jonas, P. (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 45-56.
- Bayer, S.A. & Altman, J. (1991) Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience*, **45**, 391-412.
- Behan, M. & Haberly, L.B. (1999) Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol*, **408**, 532-548.
- Beier, K. (2016) Anterograde viral tracer methods. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. 203-241.
- Bennett, C.M. & Baird, A.A. (2006) Anatomical changes in the emerging adult brain: a voxel-based morphometry study. *Hum Brain Mapp*, **27**, 766-777.
- Berning, M., Boergens, K.M. & Helmstaedter, M. (2015) SegEM: Efficient image analysis for high-resolution connectomics. *Neuron*, **87**, 1193-1206.
- Bevan, M.D., Clarke, N.P. & Bolam, J.P. (1997) Synaptic integration of functionally diverse pallidal information in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci*, **17**, 308-324.
- Bhuiyan, M.E., Waki, H., Gouraud, S.S., Takagishi, M., Kohsaka, A. & Maeda, M. (2011) Histamine receptor H1 in the nucleus tractus solitarii regulates arterial pressure and heart rate in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **301**, 523-529.
- Blue, M.E. & Parnavelas, J.G. (1983) The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J Neurocytol*, **12**, 599-616.
- Bocher, M., Chisin, R., Parag, Y., Freedman, N., Meir Weil, Y., Lester, H., Mishani, E. & Bonne, O. (2001) Cerebral activation associated with sexual arousal in response to a pornographic clip: A 15O-H2O PET study in heterosexual men. *Neuroimage*, **14**, 105-117.
- Bohland, J.W., Wu, C., Barbas, H., Bokil, H., Bota, M., Breiter, H.C., Cline, H.T., Doyle, J.C., Freed, P.J., Greenspan, R.J., Haber, S.N., Hawrylycz, M., Herrera, D.G., Hilgetag, C.C., Huang, Z.J., Jones, A., Jones, E.G., Karten, H.J., Kleinfeld, D., Kötter, R., Lester, H.A., Lin, J.M., Mensh, B.D., Mikula, S., Panksepp, J., Price, J.L., Safdieh, J., Saper, C.B., Schiff, N.D., Schmammann, J.D., Stillman, B.W., Svoboda, K., Swanson, L.W., Toga, A.W., Van Essen, D.C., Watson, J.D. & Mitra, P.P. (2009) A proposal for a coordinated effort for the determination of brainwide neuroanatomical connectivity in model organisms at a mesoscopic scale. *PLoS Comput Biol*, **5**, e1000334-1000339.
- Borra, E., Luppino, G., Gerbella, M., Rozzi, S. & Rockland, K.S. (2020) Projections to the putamen from neurons located in the white matter and the claustrum in the macaque. *J Comp Neurol*, **528**, 453-467.

- Botvinick, M.M. (2007) Conflict monitoring and decision making: reconciling two perspectives on anterior cingulate function. *Cogn Affect Behav Neurosci*, **7**, 356-366.
- Braak, E., Sandmann-Keil, D., Rüb, U., Gai, W.P., de Vos, R.A., Steur, E.N., Arai, K. & Braak, H. (2001) alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol*, **101**, 195-201.
- Braak, H. & Braak, E. (1982) Neuronal types in the claustrum of man. *Anat Embryol (Berl)*, **163**, 447-460.
- Braak, H., Sastre, M. & Del Tredici, K. (2007) Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, **114**, 231-241.
- Brand, S. (1981) A serial section Golgi analysis of the primate claustrum. *Anat Embryol (Berl)*, **162**, 475-488.
- Brodmann, K. (2006) Brodmann's localisation in the cerebral cortex. In Garey, L.J. (ed) (*Originally published as Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. Leipzig: Johann Ambrosius Bart, 1909*). Springer US, New York, pp. 298.
- Brown, A. (2003) Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *J Cell Biol*, **160**, 817-821.
- Brown, S.P., Mathur, B.N., Olsen, S.R., Luppi, P.-H., Bickford, M.E. & Citri, A. (2017) New breakthroughs in understanding the role of functional interactions between the neocortex and the claustrum. *J Neurosci*, **37**, 10877-10881.
- Bruen, P.D., McGeown, W.J., Shanks, M.F. & Venneri, A. (2008) Neuroanatomical correlates of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Brain*, **131**, 2455-2463.
- Bruguier, H., Suarez, R., Manger, P., Hoerder-Suabedissen, A., Shelton, A.M., Oliver, D.K., Packer, A.M., Ferran, J.L., García-Moreno, F., Puelles, L. & Molnár, Z. (2020) In search of common developmental and evolutionary origin of the claustrum and subplate. *J Comp Neurol*, **528**, 2956– 2977.
- Buchanan, K.J. & Johnson, J.I. (2011) Diversity of spatial relationships of the claustrum and insula in branches of the mammalian radiation. *Ann N Y Acad Sci*, **1225 Suppl 1**, E30-63.
- Burdach, K.F. (2012) Vom Baue und Leben des Gehirns. In Press, N. (ed), New York, pp. 290.
- Burgess, C.R. & Peever, J.H. (2013) A noradrenergic mechanism functions to couple motor behavior with arousal state. *Curr Biol*, **23**, 1719-1725.

- Buzsáki, G., Logothetis, N. & Singer, W. (2013) Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron*, **80**, 751-764.
- Buzsáki, G. & Schomburg, E.W. (2015) What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nat Neurosci*, **18**, 484-489.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H. & Moore, C.I. (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, **459**, 663-667.
- Carey, R.G., Bear, M.F. & Diamond, I.T. (1980) The laminar organization of the reciprocal projections between the claustrum and striate cortex in the tree shrew, *Tupaia glis*. *Brain Res*, **184**, 193-198.
- Carter, C.S. & van Veen, V. (2007) Anterior cingulate cortex and conflict detection: an update of theory and data. *Cogn Affect Behav Neurosci*, **7**, 367-379.
- Cascella, N.G., Gerner, G.J., Fieldstone, S.C., Sawa, A. & Schretlen, D.J. (2011) The insula-claustrum region and delusions in schizophrenia. *Schizophr Res*, **133**, 77-81.
- Chachich, M.E. & Powell, D.A. (2004) The role of claustrum in Pavlovian heart rate conditioning in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): anatomical, electrophysiological, and lesion studies. *Behav Neurosci*, **118**, 514-525.
- Chau, A., Salazar, A.M., Krueger, F., Cristofori, I. & Grafman, J. (2015) The effect of claustrum lesions on human consciousness and recovery of function. *Conscious Cogn*, **36**, 256-264.
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V. & Deisseroth, K. (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, **497**, 332-337.
- Clancy, B., Silva-Filho, M. & Friedlander, M.J. (2001) Structure and projections of white matter neurons in the postnatal rat visual cortex. *J Comp Neurol*, **434**, 233-252.
- Clarey, J.C. & Irvine, D.R. (1986) Auditory response properties of neurons in the claustrum and putamen of the cat. *Exp Brain Res*, **61**, 432-437.
- Clasca, F., Porrero, C., Galazao, M.J., Rubio-Garrido, P., Evangelio, M. (2016) Anatomy and development of multispecific thalamocortical axons: Implications for cortical dynamics and evolution. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. 70-88.
- Connors, B.W., Zolnik, T.A. & Lee, S.C. (2010) Enhanced functions of electrical junctions. *Neuron*, **67**, 354-356.

- Coogan, T.A. & Burkhalter, A. (1990) Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex. *Exp Brain Res*, **80**, 49-53.
- Coogan, T.A. & Burkhalter, A. (1993) Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J Neurosci*, **13**, 3749-3772.
- Corcoran, M.E. (2014) Clinical relations : Epilepsy. In Smythies, J., Edelman, L., Ramachandran, V. (ed) *The claustrum, structural, functional and clinical neuroscience*. Elsevier Inc., pp. 245-262.
- Corsetti, S., Gunn-Moore, F. & Dholakia, K. (2019) Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. *J Neurosci Methods*, **319**, 16-27.
- Cortimiglia, R., Crescimanno, G., Salerno, M.T. & Amato, G. (1991) The role of the claustrum in the bilateral control of frontal oculomotor neurons in the cat. *Exp Brain Res*, **84**, 471-477.
- Cortimiglia, R., Infantellina, F., Salerno, M.T. & Zagami, M.T. (1982) Unit study in cat claustrum of the effects of iontophoretic neurotransmitters and correlations with the effects of activation of some afferent pathways. *Arch Int Physiol Biochim*, **90**, 219-230.
- Crick, F.C. & Koch, C. (2005) What is the function of the claustrum? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **360**, 1271-1279.
- Cruikshank, S.J., Ahmed, O.J., Stevens, T.R., Patrick, S.L., Gonzalez, A.N., Elmaleh, M. & Connors, B.W. (2012) Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex. *J Neurosci*, **32**, 17813-17823.
- Cucchiari, J.B. & Uhrich, D.J. (1990) Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L): a neuroanatomical tracer for electron microscopic analysis of synaptic circuitry in the cat's dorsal lateral geniculate nucleus. *J Electron Microscop Tech*, **15**, 352-368.
- Curtis, D.R. (1964) Electrophysiological methods. In Nastuk, W.L. (ed) *Physiological techniques in biological research*. Academic Press, New York and London, pp. 144-190.
- Day-Brown, J.D., Slusarczyk, A.S., Zhou, N., Quiggins, R., Petry, H.M. & Bickford, M.E. (2017) Synaptic organization of striate cortex projections in the tree shrew: A comparison of the claustrum and dorsal thalamus. *J Comp Neurol*, **525**, 1403-1420.
- Debanne, D. (2004) Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 304-316.
- Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carrier, E. & Alcaraz, G. (2011) Axon physiology. *Physiol Rev*, **91**, 555-602.

- Delevich, K., Tucciarone, J., Huang, Z.J. & Li, B. (2015) The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons. *J Neurosci*, **35**, 5743-5753.
- Didic, M., Barbeau, E.J., Felician, O., Tramon, E., Guedj, E., Poncet, M. & Ceccaldi, M. (2011) Which memory system is impaired first in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, **27**, 11-22.
- Dilgen, J., Tejada, H.A. & O'Donnell, P. (2013) Amygdala inputs drive feedforward inhibition in the medial prefrontal cortex. *J Neurophysiol*, **110**, 221-229.
- Dillingham, C.M., Mathiasen, M.L., Frost, B.E., Lambert, M.A.C., Bubb, E.J., Jankowski, M.M., Aggleton, J.P. & O'Mara, S.M. (2019) The anatomical boundary of the rat claustrum. *Front Neuroanat*, **13**, 1-17.
- Druga, R. (2014) The structure and connections of the claustrum. In Smythies, J.R., Edelman, L.R., Ramachandran, V.S. (eds) *The claustrum - Structural, functional and clinical neuroscience*. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 29-84.
- Druga, R., Chen, S. & Bentivoglio, M. (1993) Parvalbumin and calbindin in the rat claustrum: an immunocytochemical study combined with retrograde tracing frontoparietal cortex. *J Chem Neuroanat*, **6**, 399-406.
- Dubroff, J.G. & Newberg, A. (2008) Neuroimaging of traumatic brain injury. *Semin Neurol*, **28**, 548-557.
- Economo, M.N., Clack, N.G., Lavis, L.D., Gerfen, C.R., Svoboda, K., Myers, E.W. & Chandrashekar, J. (2016) A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife*, **5**, e10566-10522.
- Economo, M.N., Winnubst, J., Bas, E., Ferreira, T.A. & Chandrashekar, J. (2019) Single-neuron axonal reconstruction: The search for a wiring diagram of the brain. *J Comp Neurol*, **527**, 2190-2199.
- Edelstein, L.R. & Denaro, F.J. (2004) The claustrum: a historical review of its anatomy, physiology, cytochemistry and functional significance. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **50**, 675-702.
- Engber, D. (2011) The trouble with black-6, a tiny alcoholic takes over the lab. *Slate*, **2**, 1-17.
- Engel, A.K., Kreiter, A.K., König, P. & Singer, W. (1991) Synchronization of oscillatory neuronal responses between striate and extrastriate visual cortical areas of the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6048-6052.

- Fernández-Miranda, J.C., Rhoton, A.L., Jr., Kakizawa, Y., Choi, C. & Alvarez-Linera, J. (2008) The claustrum and its projection system in the human brain: a microsurgical and tractographic anatomical study. *J Neurosurg*, **108**, 764-774.
- Fink, R.P. & Heimer, L. (1967) Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. *Brain Res*, **4**, 369-374.
- Florence, S.L. & Casagrande, V.A. (1987) Organization of individual afferent axons in layer IV of striate cortex in a primate. *J Neurosci*, **7**, 3850-3868.
- Floresco, S.B. & Tse, M.T. (2007) Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J Neurosci*, **27**, 2045-2057.
- Frazer, S., Prados, J., Niquille, M., Cadilhac, C., Markopoulos, F., Gomez, L., Tomasello, U., Telley, L., Holtmaat, A., Jabaudon, D. & Dayer, A. (2017) Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT(3A)R expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Commun*, **8**, 14219.
- Fulton, B.P., Burne, J.F. & Raff, M.C. (1992) Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake. *J Neurosci*, **12**, 4816-4833.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Merlo Pich, E., Meller, E. & Goldstein, M. (1987) Evidence for a fast receptor turnover of D1 dopamine receptors in various forebrain regions of the rat. *Neurosci Lett*, **81**, 183-187.
- Gabbott, P.L., Warner, T.A. & Busby, S.J. (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, **139**, 1039-1048.
- Gabor, A.J. & Peele, T.L. (1964) Alterations of behavior following stimulation of the claustrum of the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **17**, 513-519.
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (2001) Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science*, **292**, 2295-2299.
- George, N. (2003) Confocal microscope systems - a comparison of technologies. In Technology, B. (ed). Olympus America.
- George, N. (2004) Spinning disk vs. laser-scanning confocal microscopes. In Spectra, P. (ed). Olympus America.
- Gerfen, C.R., Herkenham, M. & Thibault, J. (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **7**, 3915-3934.

- Gerfen, C.R. & Sawchenko, P.E. (1984) An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res*, **290**, 219-238.
- Gerfen, C.R. & Sawchenko, P.E. (2016) An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: Immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res*, **1645**, 42-45.
- Golgi, C. (1873) Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gaz. Med. Ital.*, 244-246.
- Goll, Y., Atlan, G. & Citri, A. (2015) Attention: the claustrum. *Trends in Neurosciences*, **38**, 486-495.
- Gong, H., Zeng, S., Yan, C., Lv, X., Yang, Z., Xu, T., Feng, Z., Ding, W., Qi, X., Li, A., Wu, J. & Luo, Q. (2013) Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution. *NeuroImage*, **74**, 87-98.
- Gray, E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of anatomy*, **93**, 420-433.
- Graybiel, A.M. & Devor, M. (1974) A microelectroretic delivery technique for use with horseradish peroxidase. *Brain Res*, **68**, 167-173.
- Grieve, K.L. & Sillito, A.M. (1995) Differential properties of cells in the feline primary visual cortex providing the corticofugal feedback to the lateral geniculate nucleus and visual claustrum. *J Neurosci*, **15**, 4868-4874.
- Guirado, S., Real, M.A., Olmos, J.L. & Davila, J.C. (2003) Distinct types of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse claustrum. *J Comp Neurol*, **465**, 431-444.
- Guo, C., Peng, J., Zhang, Y., Li, A., Li, Y., Yuan, J., Xu, X., Ren, M., Gong, H. & Chen, S. (2017) Single-axon level morphological analysis of corticofugal projection neurons in mouse barrel field. *Sci Rep*, **7**, 2846-2855.
- Hadjikhani, N. & Roland, P.E. (1998) Cross-modal transfer of information between the tactile and the visual representations in the human brain: A positron emission tomographic study. *J Neurosci*, **18**, 1072-1084.
- Haines, D.E. (2004) Neuroanatomy: an atlas of structures, sections and systems. In Sun, B. (ed). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA., pp. 251.

- Hammelrath, L., Škokić, S., Khmelinskii, A., Hess, A., van der Knaap, N., Staring, M., Lelieveldt, B.P.F., Wiedermann, D. & Hoehn, M. (2016) Morphological maturation of the mouse brain: An in vivo MRI and histology investigation. *NeuroImage*, **125**, 144-152.
- Han, Y., Kebschull, J.M., Campbell, R.A.A., Cowan, D., Imhof, F., Zador, A.M. & Mrsic-Flogel, T.D. (2018) The logic of single-cell projections from visual cortex. *Nature*, **556**, 51-56.
- Hatam, M., Sheybanifar, M. & Nasimi, A. (2013) Cardiovascular responses of the anterior claustrum; its mechanism; contribution of medial prefrontal cortex. *Auton Neurosci*, **179**, 68-74.
- Hellwig, B., Schüz, A. & Aertsen, A. (1994) Synapses on axon collaterals of pyramidal cells are spaced at random intervals: a Golgi study in the mouse cerebral cortex. *Biol Cybern*, **71**, 1-12.
- Hinova-Palova, D.V., Edelstein, L.R., Paloff, A.M., Hristov, S., Papantchev, V.G. & Ovtcharoff, W.A. (2007) Parvalbumin in the cat claustrum: ultrastructure, distribution and functional implications. *Acta Histochem*, **109**, 61-77.
- Hjelmstad, G.O., Xia, Y., Margolis, E.B. & Fields, H.L. (2013) Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *J Neurosci*, **33**, 6454-6459.
- Hua, Y., Laserstein, P. & Helmstaedter, M. (2015) Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. *Nat Commun*, **6**, 7923-7930.
- Ishii, K., Tsuji, H. & Tamaoka, A. (2011) Mumps virus encephalitis with symmetric claustrum lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*, **32**, E139.
- Jackson, J., Karnani, M.M., Zemelman, B.V., Burdakov, D. & Lee, A.K. (2018) Inhibitory control of prefrontal cortex by the claustrum. *Neuron*, **99**, 1029-1039.
- Jackson, J., Smith, J.B. & Lee, A.K. (2020) The anatomy and physiology of claustrum-cortex interactions. *Annu Rev Neurosci*, **43**, 231-247.
- Jakubowska-Sadowska, K., Moryś, J., Sadowski, M., Kowiański, P., Karwacki, Z. & Narkiewicz, O. (1998) Visual zone of the claustrum shows localizational and organizational differences among rat, guinea pig, rabbit and cat. *Anat Embryol (Berl)*, **198**, 63-72.
- Jensen, K.F. & Killackey, H.P. (1987) Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci*, **7**, 3529-3543.

- Johnson, J.I. & Fenske, B.A. (2014) History of the study and nomenclature of the claustrum. In Smythies, J.R., Edelman, L.R., Ramachandran, V.S. (eds) *The claustrum - Structural, functional and clinical neuroscience*. Elsevier Academic Press Amsterdam, pp. 1-27.
- Jones, M.W. & Wilson, M.A. (2005) Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol*, **3**, 402-415.
- Juraniec, J., Narkiewica, O. & Wrzolkowa, T. (1971) Axon terminals in the claustrum of the cat: an electron microscope study. *Brain Res*, **35**, 277-282.
- Jürgens, U. (1984) The efferent and afferent connections of the supplementary motor area. *Brain Res*, **300**, 63-81.
- Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M. & Pearce, R.K. (2009) Evidence against a reliable staging system of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **35**, 125-126.
- Kapakin, S. (2011) The claustrum: three-dimensional reconstruction, photorealistic imaging, and stereotactic approach. *Folia Morphol (Warsz)*, **70**, 228-234.
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L.H. & Attwell, D. (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, **438**, 1162-1166.
- Katz, L.C. (1987) Local circuitry of identified projection neurons in cat visual cortex brain slices. *J Neurosci*, **7**, 1223-1249.
- Kebschull, J.M., Garcia da Silva, P., Reid, A.P., Peikon, I.D., Albeanu, D.F. & Zador, A.M. (2016) High-Throughput Mapping of Single-Neuron Projections by Sequencing of Barcoded RNA. *Neuron*, **91**, 975-987.
- Kemp, J.M. & Powell, T.P. (1970) The cortico-striate projection in the monkey. *Brain*, **93**, 525-546.
- Kevin Li, S., Hao, J. & Liddell, M. (2013) Electrotransport across membranes in biological media: Electrokinetic theories and applications in drug delivery. In Becker, S.M., Kuznetsov, A.V. (eds) *Transport in Biological Media*. Elsevier, Boston, pp. 417-454.
- Khlghatyan, J., Quintana, C., Parent, M. & Beaulieu, J.M. (2019) High sensitivity mapping of cortical dopamine D2 receptor expressing neurons. *Cereb Cortex*, **29**, 3813-3827.
- Kim, J., Matney, C.J., Roth, R.H. & Brown, S.P. (2016) Synaptic organization of the neuronal circuits of the claustrum. *J Neurosci*, **36**, 773-784.
- Kim, J., Yamanaka, K., Tsukioka, K. & Waki, H. (2020) Potential role of the amygdala and posterior claustrum in exercise intensity-dependent cardiovascular regulation in rats. *Neuroscience*, **432**, 150-159.

- Kincaid, A.E., Zheng, T. & Wilson, C.J. (1998) Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J Neurosci*, **18**, 4722-4731.
- Kirk, I.J., Oddie, S.D., Konopacki, J. & Bland, B.H. (1996) Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci*, **16**, 5547-5554.
- Kitanishi, T. & Matsuo, N. (2017) Organization of the claustrum-to-entorhinal cortical connection in mice. *J Neurosci*, **37**, 269-280.
- Koubeissi, M.Z., Bartolomei, F., Beltagy, A. & Picard, F. (2014) Electrical stimulation of a small brain area reversibly disrupts consciousness. *Epilepsy Behav*, **37**, 32-35.
- Krettek, J.E. & Price, J.L. (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, **171**, 157-191.
- Kriegler, S. & Chiu, S.Y. (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci*, **13**, 4229-4245.
- Krimmel, S.R., Qadir, H., Hesselgrave, N., White, M.G., Reser, D.H., Mathur, B.N. & Seminowicz, D.A. (2019) Resting state functional connectivity of the rat claustrum. *Front Neuroanat*, **13**, 22-29.
- Krnjevic, K., Mitchell, J.F. and Szerb, J.C. (1963) Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes. *The Journal of Physiology*, **165**, 421-436.
- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E. & Dietrich, D. (2007) Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci*, **10**, 311-320.
- Künzle, H. & Akert, K. (1977) Efferent connections of cortical, area 8 (frontal eye field) in *Macaca fascicularis*. A reinvestigation using the autoradiographic technique. *J Comp Neurol*, **173**, 147-164.
- Kurada, L., Bayat, A., Joshi, S. & Koubeissi, M.Z. (2019) The claustrum in relation to seizures and electrical stimulation. *Front Neuroanat*, **13**, 8-15.
- Kuramoto, E., Iwai, H., Yamanaka, A., Ohno, S., Seki, H., Tanaka, Y.R., Furuta, T., Hioki, H. & Goto, T. (2017) Dorsal and ventral parts of thalamic nucleus submedialis project to different areas of rat orbitofrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors. *J Comp Neurol*, **525**, 3821-3839.
- Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C.E. & Padt, R.E. (1977) Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain. *Neuroscience Letters*, **6**, 127-133.

- LeVay, S. (1986) Synaptic organization of claustral and geniculate afferents to the visual cortex of the cat. *J Neurosci*, **6**, 3564-3575.
- LeVay, S. & Sherk, H. (1981) The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections. *J Neurosci*, **1**, 956-980.
- Lévesque, M. & Parent, A. (1998) Axonal arborization of corticostriatal and corticothalamic fibers arising from prelimbic cortex in the rat. *Cereb Cortex*, **8**, 602-613.
- Li, S., Mealing, G.A., Morley, P. & Stys, P.K. (1999) Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *J Neurosci*, **19**, 16-25.
- Li, X., Yu, B., Sun, Q., Zhang, Y., Ren, M., Zhang, X., Li, A., Yuan, J., Madisen, L., Luo, Q., Zeng, H., Gong, H. & Qiu, Z. (2018) Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 415-420.
- Li, Y.T., Ibrahim, L.A., Liu, B.H., Zhang, L.I. & Tao, H.W. (2013) Linear transformation of thalamocortical input by intracortical excitation. *Nat Neurosci*, **16**, 1324-1330.
- Lin, H.M., Kuang, J.X., Sun, P., Li, N., Lv, X. & Zhang, Y.H. (2018) Reconstruction of intratelencephalic neurons in the mouse secondary motor cortex reveals the diverse projection patterns of single neurons. *Front Neuroanat*, **12**, 86-97.
- Liu, J., Wu, R., Johnson, B., Vu, J., Bass, C. & Li, J.X. (2019) The claustrum-prefrontal cortex pathway regulates impulsive-like behavior. *J Neurosci*, **39**, 10071-10080.
- Loo, Y. (1931) The forebrain of the opossum, *Didelphis virginiana*. Part I. Gross anatomy. *J Comp Neurol*, **51**, 13-64.
- Lübke, J., Egger, V., Sakmann, B. & Feldmeyer, D. (2000) Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci*, **20**, 5300-5311.
- Majak, K., Pikkarainen, M., Kemppainen, S., Jolkkonen, E. & Pitkanen, A. (2002) Projections from the amygdaloid complex to the claustrum and the endopiriform nucleus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, **451**, 236-249.
- Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H. & Watson, S.J. (1994a) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, **350**, 412-438.
- Mansour, A., Fox, C.A., Meng, F., Akil, H. & Watson, S.J. (1994b) Kappa 1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to kappa receptor binding and prodynorphin mRNA. *Mol Cell Neurosci*, **5**, 124-144.

- Masopust, D., Sivula, C.P. & Jameson, S.C. (2017) Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *J Immunol*, **199**, 383-388.
- Mathur, B.N. (2014) The claustrum in review. *Front Syst Neurosci*, **8**, 48-59.
- Mathur, B.N., Caprioli, R.M. & Deutch, A.Y. (2009) Proteomic analysis illuminates a novel structural definition of the claustrum and insula. *Cereb Cortex*, **19**, 2372-2379.
- McGarry, L.M. & Carter, A.G. (2016) Inhibitory gating of basolateral amygdala inputs to the prefrontal cortex. *J Neurosci*, **36**, 9391-9406.
- McGuire, B.A., Hornung, J.P., Gilbert, C.D. & Wiesel, T.N. (1984) Patterns of synaptic input to layer 4 of cat striate cortex. *J Neurosci*, **4**, 3021-3033.
- Mengual, E., Prensa, L., Tripathi, A., Cebrian, C., Mongia, S. (2016) Comparative analysis of the axonal collateralization patterns of basal ganglia output nuclei in the rat. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. 47-64.
- Mijnster, M.J., Isovich, E., Flügge, G. & Fuchs, E. (1999) Localization of dopamine receptors in the tree shrew brain using [3H]-SCH23390 and [125I]-epidepride. *Brain Res*, **841**, 101-113.
- Milardi, D., Bramanti, P., Milazzo, C., Finocchio, G., Arrigo, A., Santoro, G., Trimarchi, F., Quartarone, A., Anastasi, G. & Gaeta, M. (2013) Cortical and subcortical connections of the human claustrum revealed in vivo by constrained spherical deconvolution tractography. *Cerebral Cortex*, **25**, 406-414.
- Milardi, D., Bramanti, P., Milazzo, C., Finocchio, G., Arrigo, A., Santoro, G., Trimarchi, F., Quartarone, A., Anastasi, G. & Gaeta, M. (2015) Cortical and subcortical connections of the human claustrum revealed in vivo by constrained spherical deconvolution tractography. *Cereb Cortex*, **25**, 406-414.
- Miller, J.A., Ding, S.-L., Sunkin, S.M., Smith, K.A., Ng, L., Szafer, A., Ebbert, A., Riley, Z.L., Royall, J.J., Aiona, K., Arnold, J.M., Bennet, C., Bertagnolli, D., Brouner, K., Butler, S., Caldejon, S., Carey, A., Cuhaciyan, C., Dalley, R.A., Dee, N., Dolbeare, T.A., Facer, B.A.C., Feng, D., Fliss, T.P., Gee, G., Goldy, J., Gourley, L., Gregor, B.W., Gu, G., Howard, R.E., Jochim, J.M., Kuan, C.L., Lau, C., Lee, C.-K., Lee, F., Lemon, T.A., Lesnar, P., McMurray, B., Mastan, N., Mosqueda, N., Naluai-Cecchini, T., Ngo, N.-K., Nyhus, J., Oldre, A., Olson, E., Parente, J., Parker, P.D., Parry, S.E., Stevens, A., Pletikos, M., Reding, M., Roll, K., Sandman, D., Sarreal, M., Shapouri, S., Shapovalova, N.V., Shen, E.H., Sjoquist, N., Slaughterbeck, C.R., Smith, M., Sodt, A.J., Williams, D., Zöllei, L., Fischl, B., Gerstein, M.B., Geschwind, D.H., Glass, I.A., Hawrylycz, M.J., Hevner, R.F., Huang, H., Jones, A.R., Knowles, J.A., Levitt, P., Phillips, J.W., Šestan, N., Wohnoutka, P., Dang, C., Bernard, A., Hohmann, J.G. & Lein, E.S. (2014) Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature*, **508**, 199-206.

- Minciacchi, D., Molinari, M., Bentivoglio, M. & Macchi, G. (1985) The organization of the ipsi- and contralateral claustric system in rat with notes on the bilateral claustric projections in cat. *Neuroscience*, **16**, 557-576.
- Mohapel, P., Zhang, X., Gillespie, G.W., Chlan-Fourney, J., Hannesson, D.K., Corley, S.M., Li, X.M. & Corcoran, M.E. (2001) Kindling of claustrum and insular cortex: comparison to perirhinal cortex in the rat. *Eur J Neurosci*, **13**, 1501-1519.
- Moryś, J., Berdel, B., Maciejewska, B., Król, J. & Dziewiatkowski, J. (1996) Loss of neurons in the claustrum of aging brain. *Folia Neuropathol*, **34**, 97-101.
- Morys, J., Bobinski, M., Wegiel, J., Wisniewski, H.M. & Narkiewicz, O. (1996) Alzheimer's disease severely affects areas of the claustrum connected with the entorhinal cortex. *J Hirnforsch*, **37**, 173-180.
- Morys, J., Narkiewicz, O. & Wisniewski, H.M. (1993) Neuronal loss in the human claustrum following ulegyria. *Brain Res*, **616**, 176-180.
- Moryś, J., Sadowski, M., Barcikowska, M., Maciejewska, B. & Narkiewicz, O. (1994) The second layer neurones of the entorhinal cortex and the perforant path in physiological ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **54**, 47-53.
- Muir, J.L. (1996) Attention and stimulus processing in the rat. *Brain Res Cogn Brain Res*, **3**, 215-225.
- Naghavi, H.R., Eriksson, J., Larsson, A. & Nyberg, L. (2007) The claustrum/insula region integrates conceptually related sounds and pictures. *Neurosci Lett*, **422**, 77-80.
- Naqvi, N.H. & Bechara, A. (2010) The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain Struct Funct*, **214**, 435-450.
- Narikiyo, K., Mizuguchi, R., Ajima, A., Shiozaki, M., Hamanaka, H., Johansen, J.P., Mori, K. & Yoshihara, Y. (2020) The claustrum coordinates cortical slow-wave activity. *Nat Neurosci*, **23**, 741-753.
- Narkiewicz, O. (1964) Degenerations in the claustrum after regional neocortical ablations in the cat. *J Comp Neurol*, **123**, 335-355.
- Nauta, W.J. & Gyax, P.A. (1954) Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technic. *Stain Technol*, **29**, 91-93.
- Nissl, F. (1894) Ueber eine neue untersuchungsmethode des zentralorgans speciell zur feststellung der localisation der nervenzellen. *Neurol. Zentralbl.*, **13**, 337-344.

- Norimoto, H., Fenk, L.A., Li, H.H., Tosches, M.A., Gallego-Flores, T., Hain, D., Reiter, S., Kobayashi, R., Macias, A., Arends, A., Klinkmann, M. & Laurent, G. (2020) A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep. *Nature*, **578**, 413-418.
- Norita, M. (1977) Demonstration of bilateral claustrum-cortical connections in the cat with the method of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Arch Histol Jpn*, **40**, 1-10.
- Ogomori, K., Kitamoto, T., Tateishi, J., Sato, Y., Suetsugu, M. & Abe, M. (1989) Beta-protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **134**, 243-251.
- Oh, S.W., Harris, J.A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., Wang, Q., Lau, C., Kuan, L., Henry, A.M., Mortrud, M.T., Ouellette, B., Nguyen, T.N., Sorensen, S.A., Slaughterbeck, C.R., Wakeman, W., Li, Y., Feng, D., Ho, A., Nicholas, E., Hirokawa, K.E., Bohn, P., Joines, K.M., Peng, H., Hawrylycz, M.J., Phillips, J.W., Hohmann, J.G., Wohnoutka, P., Gerfen, C.R., Koch, C., Bernard, A., Dang, C., Jones, A.R. & Zeng, H. (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, **508**, 207-214.
- Olson, C.R. & Graybiel, A.M. (1980) Sensory maps in the claustrum of the cat. *Nature*, **288**, 479-481.
- Parekh, R. & Ascoli, G.A. (2015) Quantitative investigations of axonal and dendritic arbors: development, structure, function, and pathology. *Neuroscientist*, **21**, 241-254.
- Parent, M. & Parent, A. (2006) Single-axon tracing study of corticostriatal projections arising from primary motor cortex in primates. *J Comp Neurol*, **496**, 202-213.
- Parent, M., Parent, A. (2016a) The primate basal ganglia connectome as revealed by Single-Axon tracing. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. 27-44.
- Parent, M., Parent, A. (2016b) The Primate Basal Ganglia Connectome As Revealed By Single-Axon Tracing. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. 27-46.
- Park, S., Tyszka, J.M. & Allman, J.M. (2012) The claustrum and insula in *microcebus murinus*: A high resolution diffusion imaging study. *Front Neuroanat*, **6**, 1-21.
- Pathak, S., Fernandez-Miranda, J.C. (2014) Structural and functional connectivity of the claustrum in the human brain. In Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. (ed) *The claustrum, structural, functional and clinical neuroscience*. Elsevier Inc., pp. 209-224.
- Patzke, N., Innocenti, G.M. & Manger, P.R. (2014) The claustrum of the ferret: afferent and efferent connections to lower and higher order visual cortical areas. *Front Syst Neurosci*, **8**, 31-42.

- Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. In Press, E.A. (ed). Elsevier Academic Press, pp. 256.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. In Press, E.A. (ed). Elsevier Academic Press, pp. 160.
- Pearson, R.C., Brodal, P., Gatter, K.C. & Powell, T.P. (1982) The organization of the connections between the cortex and the claustrum in the monkey. *Brain Res*, **234**, 435-441.
- Petrof, I. & Sherman, S.M. (2013) Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *J Physiol*, **591**, 3125-3131.
- Pham, X., Wright, D.K., Atapour, N., Chan, J.M., Watkins, K.J., Worthy, K.H., Rosa, M., Reichelt, A. & Reser, D.H. (2019) Internal subdivisions of the marmoset claustrum complex: Identification by myeloarchitectural features and high field strength imaging. *Front Neuroanat*, **13**, 96-109.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S. & Rubenstein, J.L. (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol*, **424**, 409-438.
- Purves, R. (1980) Iontophoresis - progress and pitfalls. *Trends in Neurosciences*, **3**, 245-247.
- Qadir, H., Krimmel, S.R., Mu, C., Pouloupoulos, A., Seminowicz, D.A. & Mathur, B.N. (2018) Structural connectivity of the anterior cingulate cortex, claustrum, and the anterior insula of the mouse. *Front Neuroanat*, **12**, 100-112.
- Qadir, H. & Mathur, B.N. (2019) Identifying SUM projections to claustrum is about knowing your limits. *Claustrum*, **4**, 1-4.
- Qurrat ul, A. & Abidi, T.S. (2005) Unraveling the function of claustrum. *J Pak Med Assoc*, **55**, 123-125.
- Rahman, F.E. & Baizer, J.S. (2007) Neurochemically defined cell types in the claustrum of the cat. *Brain Res*, **1159**, 94-111.
- Rama, S., Zbili, M. & Debanne, D. (2018) Signal propagation along the axon. *Curr Opin Neurobiol*, **51**, 37-44.
- Ramon y Cajal, S. (1900) Estudios sobre la corteza cerebral humana *Estrutura de la corteza acustica*. Micrografica 5, pp. 129-183.

- Rauch, S.L., Shin, L.M., Dougherty, D.D., Alpert, N.M., Orr, S.P., Lasko, M., Macklin, M.L., Fischman, A.J. & Pitman, R.K. (1999) Neural activation during sexual and competitive arousal in healthy men. *Psychiatry Res*, **91**, 1-10.
- Real, M.A., Davila, J.C. & Guirado, S. (2003) Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum. *J Chem Neuroanat*, **25**, 151-160.
- Reiner, A., Veenman, C.L., Medina, L., Jiao, Y., Del Mar, N. & Honig, M.G. (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*, **103**, 23-37.
- Remedios, R., Logothetis, N.K. & Kayser, C. (2010) Unimodal responses prevail within the multisensory claustrum. *J Neurosci*, **30**, 12902-12907.
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P. & Tessier-Lavigne, M. (2014) iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, **159**, 896-910.
- Renouard, L., Billwiller, F., Ogawa, K., Clément, O., Camargo, N., Abdelkarim, M., Gay, N., Scoté-Blachon, C., Touré, R., Libourel, P.A., Ravassard, P., Salvert, D., Peyron, C., Claustrat, B., Léger, L., Salin, P., Malleret, G., Fort, P. & Luppi, P.H. (2015) The supramammillary nucleus and the claustrum activate the cortex during REM sleep. *Sci Adv*, **1**, e1400177-1400191.
- Reser, D.H., Richardson, K.E., Montibeller, M.O., Zhao, S., Chan, J.M., Soares, J.G., Chaplin, T.A., Gattass, R. & Rosa, M.G. (2014) Claustrum projections to prefrontal cortex in the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Front Syst Neurosci*, **8**, 123-133.
- Reynhout, K. & Baizer, J.S. (1999) Immunoreactivity for calcium-binding proteins in the claustrum of the monkey. *Anat Embryol (Berl)*, **199**, 75-83.
- Rockland, K.S. (1994) Further evidence for two types of corticopulvinar neurons. *Neuroreport*, **5**, 1865-1868.
- Rockland, K.S. (1996) Two types of corticopulvinar terminations: round (type 2) and elongate (type 1). *J Comp Neurol*, **368**, 57-87.
- Rockland, K.S. (2002) Visual cortical organization at the single axon level: a beginning. *Neurosci Res*, **42**, 155-166.
- Rockland, K.S. (2013) Collateral branching of long-distance cortical projections in monkey. *J Comp Neurol*, **521**, 4112-4123.
- Rockland, K.S. (2016a) Introduction. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. xvii-xxi.

- Rockland, K.S. (2016b) Preface. In Rockland, K.S. (ed) *Axons and Brain Architecture*. Academic Press, San Diego, pp. xi.
- Rockland, K.S. (2018) Axon Collaterals and Brain States. *Front Syst Neurosci*, **12**, 32-38.
- Rockland, K.S. (2019) Corticothalamic axon morphologies and network architecture. *Eur J Neurosci*, **49**, 969-977.
- Rockland, K.S. (2020) What we can learn from the complex architecture of single axons. *Brain Struct Funct*, **225**, 1327-1347.
- Roubertoux, P. (1982) Des souris et des hommes *Enfance*, pp. 259-265.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. (2005) Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*, **109**, 5-13.
- Sanides, D. & Buchholtz, C.S. (1979) Identification of the projection from the visual cortex to the claustrum by anterograde axonal transport in the cat. *Exp Brain Res*, **34**, 197-200.
- Sarkar, S. & Heise, M.T. (2019) Mouse Models as Resources for Studying Infectious Diseases. *Clin Ther*, **41**, 1912-1922.
- Schwab, M.E., Javoy-Agid, F. & Agid, Y. (1978) Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. *Brain Res*, **152**, 145-150.
- Schwindt, G.C. & Black, S.E. (2009) Functional imaging studies of episodic memory in Alzheimer's disease: a quantitative meta-analysis. *Neuroimage*, **45**, 181-190.
- Segundo, J.P. & Machne, X. (1956) Unitary responses to afferent volleys in lenticular nucleus and claustrum. *J Neurophysiol*, **19**, 325-339.
- Seidl, A.H. & Rubel, E.W. (2016) Systematic and differential myelination of axon collaterals in the mammalian auditory brainstem. *Glia*, **64**, 487-494.
- Selemon, L.D. & Goldman-Rakic, P.S. (1988) Common cortical and subcortical targets of the dorsolateral prefrontal and posterior parietal cortices in the rhesus monkey: evidence for a distributed neural network subserving spatially guided behavior. *J Neurosci*, **8**, 4049-4068.
- Shepherd, G.M., Raastad, M. & Andersen, P. (2002) General and variable features of varicosity spacing along unmyelinated axons in the hippocampus and cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6340-6345.
- Sherk, H. & LeVay, S. (1981) Visual claustrum: topography and receptive field properties in the cat. *Science*, **212**, 87-89.

- Shibata, S., Komaki, Y., Seki, F., Inouye, M.O., Nagai, T. & Okano, H. (2015) Connectomics: comprehensive approaches for whole-brain mapping. *Microscopy (Oxf)*, **64**, 57-67.
- Sitte, H.H., Pifl, C., Rajput, A.H., Hortnagl, H., Tong, J., Lloyd, G.K., Kish, S.J. & Hornykiewicz, O. (2017a) Dopamine and noradrenaline, but not serotonin, in the human claustrum are greatly reduced in patients with Parkinson's disease: possible functional implications. *Eur J Neurosci*, **45**, 192-197.
- Sitte, H.H., Pifl, C., Rajput, A.H., Hörtnagl, H., Tong, J., Lloyd, G.K., Kish, S.J. & Hornykiewicz, O. (2017b) Dopamine and noradrenaline, but not serotonin, in the human claustrum are greatly reduced in patients with Parkinson's disease: possible functional implications. *Eur J Neurosci*, **45**, 192-197.
- Sloniewski, P., Usunoff, K.G. & Pilgrim, C. (1986) Retrograde transport of fluorescent tracers reveals extensive ipsi- and contralateral claustricortical connections in the rat. *J Comp Neurol*, **246**, 467-477.
- Smith, J.B. & Alloway, K.D. (2010) Functional specificity of claustrum connections in the rat: interhemispheric communication between specific parts of motor cortex. *J Neurosci*, **30**, 16832-16844.
- Smith, J.B. & Alloway, K.D. (2014) Interhemispheric claustral circuits coordinate sensory and motor cortical areas that regulate exploratory behaviors. *Front Syst Neurosci*, **8**, 93-107.
- Smith, J.B., Watson, G.D.R., Liang, Z., Liu, Y., Zhang, N. & Alloway, K.D. (2019) A role for the claustrum in salience processing? *Front Neuroanat*, **13**, 64-78.
- Smythies, J., Edelstein, L. & Ramachandran, V. (2012) Hypotheses relating to the function of the claustrum. *Front Integr Neurosci*, **6**, 53-67.
- Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. (2014) Hypotheses relating to the function of the claustrum. In Smythies, J., Edelstein, L., Ramachandran, V. (ed) *The claustrum, structural, functional and clinical neuroscience*. Elsevier Inc., pp. 299-340.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, **459**, 698-702.
- Spector, I., Hassmannova, J. & Albe-Fessard, D. (1974) Sensory properties of single neurons of cat's claustrum. *Brain Research*, **66**, 39-65.
- Sperner, J., Sander, B., Lau, S., Krude, H. & Scheffner, D. (1996) Severe transitory encephalopathy with reversible lesions of the claustrum. *Pediatr Radiol*, **26**, 769-771.
- Sporns, O., Tononi, G. & Kötter, R. (2005) The human connectome: A structural description of the human brain. *PLoS Comput Biol*, **1**, 245-252.

- Stanton, G.B., Goldberg, M.E. & Bruce, C.J. (1988) Frontal eye field efferents in the macaque monkey: I. Subcortical pathways and topography of striatal and thalamic terminal fields. *J Comp Neurol*, **271**, 473-492.
- Stepanyants, A. & Chklovskii, D.B. (2005) Neurogeometry and potential synaptic connectivity. *Trends Neurosci*, **28**, 387-394.
- Stiefel, K.M., Merrifield, A. & Holcombe, A.O. (2014) The claustrum's proposed role in consciousness is supported by the effect and target localization of *Salvia divinorum*. *Front Integr Neurosci*, **8**, 20-27.
- Stoléru, S., Grégoire, M.C., Gérard, D., Decety, J., Lafarge, E., Cinotti, L., Lavenne, F., Le Bars, D., Vernet-Maury, E., Rada, H., Collet, C., Mazoyer, B., Forest, M.G., Magnin, F., Spira, A. & Comar, D. (1999) Neuroanatomical correlates of visually evoked sexual arousal in human males. *Arch Sex Behav*, **28**, 1-21.
- Suzuki, M., Hurd, Y.L., Sokoloff, P., Schwartz, J.C. & Sedvall, G. (1998) D3 dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain Res*, **779**, 58-74.
- Takagishi, M., Gouraud, S.S., Bhuiyan, M.E., Kohsaka, A., Maeda, M. & Waki, H. (2014) Activation of histamine H1 receptors in the nucleus tractus solitarii attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. *Acta Physiol (Oxf)*, **211**, 73-81.
- Tallin, V. (2019) Le claustrum du monastère dominicain.
- Terem, A., Gonzales, B.J., Peretz-Rivlin, N., Ashwal-Fluss, R., Bleistein, N., Del Mar Reus-Garcia, M., Mukherjee, D., Groysman, M. & Citri, A. (2020) Claustral neurons projecting to frontal cortex mediate contextual association of reward. *Curr Biol*, **30**, 3522-3532.
- Tomasi, S., Caminiti, R. & Innocenti, G.M. (2012) Areal differences in diameter and length of corticofugal projections. *Cereb Cortex*, **22**, 1463-1472.
- Torgerson, C.M., Irimia, A., Goh, S.Y. & Van Horn, J.D. (2015) The DTI connectivity of the human claustrum. *Hum Brain Mapp*, **36**, 827-838.
- Torgerson, C.M. & Van Horn, J.D. (2014) A case study in connectomics: the history, mapping, and connectivity of the claustrum. *Front Neuroinform*, **8**, 83-103.
- Vanhooren, V. & Libert, C. (2013) The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev*, **12**, 8-21.
- Varga, V., Hangya, B., Kránitz, K., Ludányi, A., Zemankovics, R., Katona, I., Shigemoto, R., Freund, T.F. & Borhegyi, Z. (2008) The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *J Physiol*, **586**, 3893-3915.

- Vidyasagar, T.R. & Levichkina, E. (2019) An integrated neuronal model of claustral function in timing the synchrony between cortical areas. *Front Neural Circuits*, **13**, 3-11.
- von Engelhardt, J., Khrulev, S., Eliava, M., Wahlster, S. & Monyer, H. (2011) 5-HT(3A) receptor-bearing white matter interstitial GABAergic interneurons are functionally integrated into cortical and subcortical networks. *J Neurosci*, **31**, 16844-16854.
- Vrensen, G. & De Groot, D. (1975) The effects of monocular deprivation on synaptic terminals in the visual cortex of rabbits. A quantitative electron microscopic study. *Brain Res*, **93**, 15-24.
- Wang, Q. & Burkhalter, A. (2007) Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol*, **502**, 339-357.
- Wang, Q., Cetin, A., Naemi, M., Knox, J., Zeng, H., harris, J.A. (2018) Subcortical afferents to the claustrum in the mouse brain. *Society for Neuroscience*. Neuroscience Meeting Planner, San Diego.
- Wang, Q., Ng, L., Harris, J.A., Feng, D., Li, Y., Royall, J.J., Oh, S.W., Bernard, A., Sunkin, S.M., Koch, C. & Zeng, H. (2017) Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *J Comp Neurol*, **525**, 1317-1346.
- Wanner, A.A., Kirschmann, M.A. & Genoud, C. (2015) Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience. *J Microsc*, **259**, 137-142.
- Watakabe, A., Ohsawa, S., Ichinohe, N., Rockland, K.S. & Yamamori, T. (2014) Characterization of claustral neurons by comparative gene expression profiling and dye-injection analyses. *Front Syst Neurosci*, **8**, 98-112.
- Watson, C. & Puelles, L. (2017) Developmental gene expression in the mouse clarifies the organization of the claustrum and related endopiriform nuclei. *J Comp Neurol*, **525**, 1499-1508.
- Watson, G.D.R., Smith, J.B. & Alloway, K.D. (2017) Interhemispheric connections between the infralimbic and entorhinal cortices: The endopiriform nucleus has limbic connections that parallel the sensory and motor connections of the claustrum. *J Comp Neurol*, **525**, 1363-1380.
- Weigert, C. (1885) Eine verbesserung der Haematoxylin Blutlaugensalzmethod fur das Centranlnervensystem. *Fortschr. Deutsch. Med.*, **3**, 236-239.
- Weiner, D.M. & Brann, M.R. (1989) The distribution of a dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *FEBS Lett*, **253**, 207-213.

- Weller, R.E., White, D.M. & Walton, M.M. (2000) Intrinsic connections in the caudal subdivision of the dorsolateral visual area (DL(C)) in squirrel monkeys. *J Comp Neurol*, **420**, 52-69.
- Wen, Q. & Chklovskii, D. (2010) To myelinate or not to myelinate? In Feldmeyer, D. (ed) *New Aspects of Axonal Structure and Function*. Springer Science+Business Media, Lbke, J.H.R., pp. 103-113.
- White, M.G., Cody, P.A., Bubser, M., Wang, H.D., Deutch, A.Y. & Mathur, B.N. (2017) Cortical hierarchy governs rat claustricortical circuit organization. *J Comp Neurol*, **525**, 1347-1362.
- White, M.G. & Mathur, B.N. (2018) Claustrum circuit components for top-down input processing and cortical broadcast. *Brain Struct Funct*, **223**, 3945-3958.
- White, M.G., Mu, C., Qadir, H., Madden, M.B., Zeng, H. & Mathur, B.N. (2020) The mouse claustrum is required for optimal behavioral performance under high cognitive demand. *Biol Psychiatry*, **88**, 719-726.
- White, M.G., Panicker, M., Mu, C., Carter, A.M., Roberts, B.M., Dharmasri, P.A. & Mathur, B.N. (2018) Anterior cingulate cortex input to the claustrum is required for top-down action control. *Cell Rep*, **22**, 84-95.
- Winnubst, J., Bas, E., Ferreira, T.A., Wu, Z., Economo, M.N., Edson, P., Arthur, B.J., Bruns, C., Rokicki, K., Schauder, D., Olbris, D.J., Murphy, S.D., Ackerman, D.G., Arshadi, C., Baldwin, P., Blake, R., Elsayed, A., Hasan, M., Ramirez, D., Dos Santos, B., Weldon, M., Zafar, A., Dudman, J.T., Gerfen, C.R., Hantman, A.W., Korff, W., Sternson, S.M., Spruston, N., Svoboda, K. & Chandrashekar, J. (2019) Reconstruction of 1,000 projection neurons reveals new cell types and organization of long-range connectivity in the mouse brain. *Cell*, **179**, 268-281.
- Wouterlood, F.G., Bol, J.G. & Steinbusch, H.W. (1987) Double-label immunocytochemistry: combination of anterograde neuroanatomical tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and enzyme immunocytochemistry of target neurons. *J Histochem Cytochem*, **35**, 817-823.
- Xiong, B., Li, A., Lou, Y., Chen, S., Long, B., Peng, J., Yang, Z., Xu, T., Yang, X., Li, X., Jiang, T., Luo, Q. & Gong, H. (2017) Precise cerebral vascular atlas in stereotaxic coordinates of whole mouse brain. *Front Neuroanat*, **11**, 128-145.
- Yamanaka, K., Gouraud, S.S., Takagishi, M., Kohsaka, A., Maeda, M. & Waki, H. (2017) Evidence for a histaminergic input from the ventral tuberomammillary nucleus to the solitary tract nucleus involved in arterial pressure regulation. *Physiol Rep*, **5**, e13095-13105.

- Yonehara, K. & Roska, B. (2016) "MAPseq"-uencing long-range neuronal projections. *Neuron*, **91**, 945-947.
- Zhang, W., Xu, D., Cui, J., Jing, X., Xu, N., Liu, J. & Bai, W. (2017) Anterograde and retrograde tracing with high molecular weight biotinylated dextran amine through thalamocortical and corticothalamic pathways. *Microsc Res Tech*, **80**, 260-266.
- Zingg, B., Dong, H.W., Tao, H.W. & Zhang, L.I. (2018) Input-output organization of the mouse claustrum. *J Comp Neurol*, **526**, 2428-2443.
- Ziskin, J.L., Nishiyama, A., Rubio, M., Fukaya, M. & Bergles, D.E. (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci*, **10**, 321-330.

Annexe 1 : Contributions détaillées

ACTIVITÉS ET CONTRIBUTIONS

Activité de conseil et travail à contrat

Assistante d'enseignement – Université du Québec à Trois-Rivières Hiver 2020

J'ai travaillé dans le laboratoire d'anatomie avec un contrat d'assistantat d'enseignement pour 15 semaines pour le cours de Neuro-anatomie. J'ai donc assisté les étudiants à la dissection et à l'observation des cerveaux humains, en plus de faire la correction des examens.

Auxiliaire de recherche au premier cycle – Université du Québec à Trois-Rivières 2017-2019

J'ai travaillé au sein du laboratoire du Dr Boire à temps partiel durant mon baccalauréat et temps pleins durant les étés. J'ai fait des chirurgies stéréotaxiques sur les cerveaux de souris, j'ai préparé plusieurs coupes histologiques, et j'ai analysé celles-ci au microscope. J'ai participé à l'élaboration des résultats de l'affiche scientifique présentée le 2 novembre 2018 au Society for Neurosciences de San Diego.

Activités de développement de la recherche

Recherche et développement – Boulangerie du Comtois, Université Laval 2016-2017

J'ai été co-directrice de production de pain pour le comité de la Boulangerie du Comtois de l'Université Laval. Je dirigeais une équipe dans le but d'élaborer une nouvelle recette de pain et sa production. Cette recette figure dans la liste des projets de recherche du laboratoire Pilot de l'Université Laval.

Expérience d'encadrement

Lucas Aboujaoudé, étudiant au 1^{er} cycle au Baccalauréat en Biologie médicale Automne 2019

Un nouvel étudiant est arrivé au sein du laboratoire en septembre 2019 pour permettre l'avancée dans un projet. Travaillant depuis plus d'un an au sein du laboratoire, j'ai donc supervisé et encadré cet étudiant dans les formations de bases de biosécurité, bons soins aux animaux et de produits dangereux de l'Université. Je lui ai montré la base du logiciel de Neurolucida, je l'ai supervisé dans la préparation de solutions et je lui ai enseigné les techniques de perfusion de souris.

Participation à des activités publiques, privées ou sans but lucratif

Comité organisateur du rallye automobile de Nicolet-Yamaska 2016-2017
Bénévolat aux loisirs de Nicolet

Comité intégrateur du baccalauréat en Sciences et technologies des aliments 2016-2017
Vice-présidente du comité d'intégration des nouveaux étudiants du baccalauréat. J'ai mis sur pieds les activités de financement tout au long de l'année permettant d'organiser les activités d'intégration.

Relais pour la vie de la Société Canadienne du cancer de Trois-Rivières Été 2018 à en cours
Je suis responsable des équipes du Relais pour la vie. Je suis la personne ressource qui dirige les capitaines d'équipe. Je suis en charge de ramasser les fonds des différentes délégations.

Entraîneur de volley-ball bénévole 2013 à 2016 et 2019-2020
J'ai été entraîneur de volleyball bénévolement durant plusieurs années au sein de l'équipe des Sudistes de l'école secondaire Jean-Nicolet. J'ai donc appris à développer mon leadership ainsi que mon autorité, tout en ayant beaucoup de plaisir avec les jeunes. J'ai dû donner de mon temps 2 soirs par semaine.

PARCOURS SCOLAIRE

J'ai commencé le baccalauréat en Sciences et technologies des aliments de l'Université Laval en Septembre 2016. J'ai interrompu ce baccalauréat après avoir complété une année. J'avais beaucoup plus d'intérêts pour la biologie médicale que pour la chimie des aliments. Lors de mon admission au sein de l'Université du Québec à Trois-Rivières au Baccalauréat en Biologie médicale à l'automne 2017, 6 cours de l'Université Laval m'ont été crédités. Cela correspond donc à un peu plus d'une session à temps complet d'accordé. Pour optimiser mon emploi du temps, j'ai décidé de terminer le baccalauréat en Biologie médicale en 2 ans. J'ai donc dû effectuer 6 cours par session plutôt que 4 ou 5 pour compenser le fait que 4 cours ne m'avaient pas été crédités (comparativement à une année complète de 10 cours). De ce fait, j'ai un cheminement plutôt particulier, mais qui m'a été très bénéfique, puisque j'ai appris à maîtriser et prioriser des tâches d'une grande charge de travail en peu de temps.

Malgré le fait que mes sessions scolaires étaient très chargées, en plus d'avoir travaillé à temps partiel dans le laboratoire de monsieur Boire et ainsi aussi contribué à mon apprentissage sur la biologie médicale en dehors de mon programme d'études, j'ai réussi à obtenir une moyenne de 4,01 sur 4,3 tout en réalisant 6 cours par session. J'ai dû aussi prendre un cours à l'été 2018 tout en réalisant mon stage d'été financé par le BRPC à temps pleins pendant 16 semaines, et j'ai réussi à obtenir la cote de A+. Les résultats des efforts constants que j'ai menés durant mon baccalauréat représentent bien la personne organisée, déterminée et travaillante que je suis.

J'ai par la suite débuté ma maîtrise à l'été 2019 et je réussirai à compléter en moins de 2 ans, c'est-à-dire en 5 sessions à temps pleins à l'automne 2020. J'ai donc réussi à suivre la cadence que j'avais au baccalauréat pour effectuer ma maîtrise rapidement, en plus d'avoir eu des embuches relatives à l'épidémie mondiale COVID-19. En effet, j'ai perdu un peu plus de deux mois de manipulations et de recherche au laboratoire puisque l'université était fermée. J'ai malgré tout été capable de terminer les manipulations expérimentales requises à l'écriture de mon mémoire suite à la réouverture des laboratoires de recherche de l'université.

PUBLICATIONS

1. Tableau synthèse des publications

Publications	
Autres articles revus par des pairs et publiés	1. A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology - Journal of Neuroscience Methods 2. Laminar distribution of cortical projection neurons to the pulvinar: a comparative study in cats and mice – Journal of Comparative Neurology
Nombre total de publications	2
Présentations scientifiques par affiche	
Envergure internationale	1. Laminar origins of the cortical projections to the lateral posterior thalamic nucleus in the mouse 2. Morphology of the projection of the visual cortex to the claustrum in the mouse: a single axon study
Total de présentations par affiche	2

2. Liste détaillée des publications

Articles revus par les pairs et publiés

J. Maranzano, M. Dadar, A. Bertrand-Grenier, **E.-M. Frigon**, J. Pellerin, S. Plante, S. Duchesne, C.L. Tardif, D. Boire, G. Bronchti (2020) A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology - Journal of Neuroscience Methods

La contribution des auteurs à cet ouvrage est détaillée ci-dessous :

Josefina Maranzano (40%): Conceptualisation, Méthodologie, Validation, Analyse, Investigation, Extraction des données, Écriture du manuscrit, Édition et révision du manuscrit, Visualisation, Supervision et Administration du projet.

Mahsa Dadar (15%): Méthodologie, Logiciel, Validation, Analyse, Extraction des données, Écriture du manuscrit, Édition et révision du manuscrit, Visualisation

Antony Bertrand-Grenier (5%): Investigation, Resource, Édition et révision du manuscrit

Eve-Marie Frigon (5%): Investigation, Édition et révision du manuscrit

Johanne Pellerin (5%): Investigation, Édition et révision du manuscrit

Sophie Plante (5%): Investigation, Édition et révision du manuscrit

Simon Duchesne (5%): Conceptualisation, Édition et révision du manuscrit

Christine L. Tardif (5%): Méthodologie, Logiciel, Édition et révision du manuscrit

Denis Boire (10%): Méthodologie, Ressources, Investigation, Extraction des données, Édition et révision du manuscrit, Supervision de Eve-Marie Frigon

Gilles Bronchti (5%): Méthodologie, Ressources, Édition et révision du manuscrit

Autres articles soumis à un comité de lecture

B. Oliveira Ferreira de Souza, **E.-M. Frigon**, R. Tremblay-Laliberté, C. Casanova, D. Boire (2020) Laminar distribution of cortical projection neurons to the pulvinar: a comparative study in cats and mice – Journal of Comparative Neurology

Bruno Oliviera Ferreira de Souza (30%): Analyse, Investigation Écriture du manuscrit, Édition et révision du manuscrit

Eve-Marie Frigon (20%): Méthodologie, Analyse, Investigation, Extraction des données, Édition et révision du manuscrit

Robert Tremblay-Laliberté (20%): Méthodologie, Investigation, Extraction des données, Édition et révision du manuscrit

Christian Casanova (15%): Conceptualisation, Écriture du manuscrit, Édition et révision du manuscrit, Visualisation Supervision, Administration du projet

Denis Boire (15%): Conceptualisation, Écriture du manuscrit, Édition et révision du manuscrit, Visualisation, Supervision, Administration du projet

Présentations scientifiques par affiche – Ailleurs dans le monde

E.-M. Frigon, J. Roy, *D. Boire (2019) Morphology of the projection of the visual cortex to the claustrum in the mouse: a single axon study. Society for Neuroscience annual meeting, Chicago

Jolanie Roy a participé à certaines chirurgies sur souris et à préparer quelques cerveaux qui ont servi à chacun de nos projets. Elle a donc contribué à environ 15% du projet. 85% du travail a été complété par moi-même étant donné qu'il m'a permis de remplir les objectifs de ma maîtrise. Dr. Boire est le directeur des travaux.

E.-M. Frigon, R. Tremblay-Laliberté, S. Stromei-Cléroux, *D. Boire (2018) Laminar origins of the cortical projections to the lateral posterior thalamic nucleus in the mouse. Society for Neuroscience annual meeting, san Diego.

Robert Tremblay-Laliberté et Samuel Stromei-Cléroux ont réalisé en partie les chirurgies sur les animaux et ont par la suite préparé le matériel histologique. Ils ont donc permis le départ du projet et ont aussi commencé la cartographie de neurones, en contribuant chacun à environ 20% du projet. J'ai poursuivi et complété la cartographie des neurones marqués à l'aide du logiciel NeuroLucida. J'ai ensuite procédé aux analyses de délimitations corticales ainsi qu'à l'élaboration des tableaux et graphiques de résultats. J'ai dû prendre des images microscopiques des coupes histologiques pour permettre l'élaboration de l'affiche. J'ai donc contribué à l'élaboration de toutes les données et à la rédaction et au montage de 60% de la présentation.

Annexe 2 : Articles publiés lors de la maîtrise

A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology

Maranzano, Josefina; Dadarc, Mahsa; Bertrand-Grenier, Antony; Frigon, Eve-Marie; Pellerin, Johanne; Plante, Sophie; Duchesne, Simon; Tardif, Christine; Boire, Denis; Bronchti, Gilles

Étude effectuée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Dre Josefina Maranzano, future directrice de thèse, lors de ma maîtrise. J'ai contribué à l'élaboration des résultats d'histologie en faisant les manipulations, et j'ai également contribué à la rédaction et la correction de l'article.

Référence : Maranzano, J., Dadar, M., Bertrand-Grenier, A., Frigon, E.-M., Pellerin, J., Plante, S., Duchesne, S., Tardif, C.L., Boire, D. & Bronchti, G. (2020) A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology. *Journal of Neuroscience Methods*, **345**, 108903.

Laminar distribution of cortical projection neurons to the pulvinar: a comparative study in cats and mice

De Souza, Bruno; Frigon, Eve-Marie; Tremblay-Laliberté, Robert; Casanova, Christian; Boire, Denis

Étude effectuée dans le cadre du baccalauréat lors de mes stages d'été BRPC ainsi qu'en travaillant à temps partiel comme assistante de recherche. A aussi fait partie de la maîtrise pour la rédaction, l'élaboration des figures et les corrections de l'article.

Référence : de Souza, B.O.F., Frigon É, M., Tremblay-Laliberté, R., Casanova, C. & Boire, D. (2020) Laminar distribution of cortical projection neurons to the pulvinar: A comparative study in cats and mice. *Journal of Comparative Neurology*, **10**, 1-15.