

Université de Montréal

Les cartes fonctionnelles dans le cortex visuel du chat : nouvelles
stratégies d'évaluation en imagerie optique et mise en évidence de
l'organisation anatomo-fonctionnelle.

Par

Matthieu P. Vanni

École d'optométrie,

Faculté de Médecine

Thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures en
vue de l'obtention du grade de doctorat en sciences biomédicales

Juin, 2010

©, Matthieu P. Vanni, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les cartes fonctionnelles dans le cortex visuel du chat: nouvelles stratégies d'évaluation en imagerie optique et mise en évidence de l'organisation anatomo-fonctionnelle.

Présentée par :

Matthieu P. Vanni

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes ;

Jean-François Bouchard

Président rapporteur

Christian Casanova

Directeur de recherche

Frédéric Lesage

Co-directeur de recherche

Stéphane Molotchnikoff

Membre du jury

Frédéric Chavane

Examineur externe

Arlette Kolta

Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Le regroupement des neurones de propriétés similaires est à l'origine de modules permettant d'optimiser l'analyse de l'information. La conséquence est la présence de cartes fonctionnelles dans le cortex visuel primaire de certains mammifères pour de nombreux paramètres tels que l'orientation, la direction du mouvement ou la position des stimuli (visuotopie).

Le premier volet de cette thèse est consacré à caractériser l'organisation modulaire dans le cortex visuel primaire pour un paramètre fondamental, la suppression centre / pourtour et au delà du cortex visuel primaire (dans l'aire 21a), pour l'orientation et la direction. Toutes les études ont été effectuées à l'aide de l'imagerie optique des signaux intrinsèques sur le cortex visuel du chat anesthésié.

La quantification de la modulation par la taille des stimuli a permis de révéler la présence de modules de forte et de faible suppression par le pourtour dans le cortex visuel primaire (aires 17 et 18). Ce type d'organisation n'avait été observé jusqu'ici que dans une aire de plus haut niveau hiérarchique chez le primate. Une organisation modulaire pour l'orientation, similaire à celle observée dans le cortex visuel primaire a été révélée dans l'aire 21a. Par contre, contrairement à l'aire 18, l'aire 21a ne semblait pas être organisée en domaine de direction. L'ensemble de ces résultats pourront permettre d'alimenter les connaissances sur l'organisation anatomo-fonctionnelle du cortex visuel du chat mais également de mieux comprendre les facteurs qui déterminent la présence d'une organisation modulaire.

Le deuxième volet abordé dans cette thèse s'est intéressé à l'amélioration de l'aspect quantitatif apporté par l'analyse temporelle en imagerie optique des signaux intrinsèques. Cette nouvelle approche, basée sur l'analyse de Fourier a permis d'augmenter considérablement le rapport signal / bruit des enregistrements. Toutefois, cette analyse ne s'est basée jusqu'ici que sur la quantification d'une seule harmonique ce qui a limité son emploi à la cartographie de l'orientation et de rétinitopie uniquement. En exploitant les plus hautes harmoniques, un modèle a été proposé afin d'estimer la taille des champs récepteurs et la sélectivité à la direction. Ce modèle a par la suite été validé par des approches conventionnelles dans le cortex visuel primaire.

Mot clé : vision, système sensoriel, imagerie fonctionnelle, Fourier, traitement d'image, traitement du signal, orientation, mouvement, primate, couplage neurovasculaire

ABSTRACT

The clustering of neurons of similar properties is at the basis of the brain modular architecture and is considered as a strategy to optimized processing. One consequence of this clustering is the presence of functional maps in the primary visual cortex of several mammals based on features such as orientation, direction of motion and stimulus position (retinotopy).

The first section of this thesis was aimed at characterizing the modular organization of functions in primary and higher-order areas. First, we investigated the possibility that a fundamental cell property, the receptive field center / surround suppression, could be orderly represented in the primary visual cortex. Second, we determined the level of modular organization in area 21a for two key properties, orientation and direction of motion. All studies were based on the optical imaging of intrinsic signals in anesthetized cats.

Results indicate the presence of high and low surround suppression modules in the primary visual cortex (areas 17 and 18). To date, such organization has been discovered only in a higher-order area in primate. A modular organization for orientation, similar to the one observed in areas 17 and 18 was observed in area 21a. On the other hand, in contrast to area 18, no direction modules were discovered in area 21a. Overall, the first part of this thesis increased our knowledge about the anatomo-fonctional organization of cat visual cortex. They will also be instrumental to better understand the factors leading to the presence of a modular organization in the cortex.

The second section of this thesis was directed to the development of a novel quantitative tool for the temporal analysis of optical imaging intrinsic signals. This new approach, based on Fourier decomposition, allowed to greatly increase the signal to noise ratio of the recordings. Until now, this analysis was only been based on single harmonic quantification, limiting its application for orientation and rétinotopy mapping only. A model exploiting higher harmonics was then developed to estimate additional parameters such as the receptive field size and direction selectivity. Thereafter, this model was validated with success by conventional approaches on the primary visual cortex.

Keywords : map, cortex, cat, optical imaging, orientation, motion, Fourier, image processing, vision, hemodynamic

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
Liste des tableaux	xiv
Remerciements	xvi

INTRODUCTION	1
1 Les voies visuelles chez le chat	2
1.1 De la rétine au cortex	2
1.2 Le cortex visuel primaire	6
1.3 La voie dorsale	11
1.4 La voie ventrale et l'aire 21a	12
1.5 Le LP-pulvinar	13
2 Cartes corticales	15
2.1 Cartes dans le cortex visuel	15
2.1.1 Rétinotopie	15
2.1.2 Orientation	16
2.1.3 Direction	19
2.1.4 Fréquence spatiale	21
2.1.5 Dominance oculaire	22
2.1.6 Interactions centre / pourtour	24
2.2 Interactions spatiales entre les cartes	24
3 Imagerie optique des signaux intrinsèques	28
3.1 De l'imagerie fonctionnelle à l'imagerie optique intrinsèque	28
3.2 La mise en évidence d'un couplage neurovasculaire	29
3.3 Les mécanismes du couplage	29
3.4 Carte d'activation	34
3.4.1 Le bruit domine le signal	34
3.4.2 Méthode de réduction de la contribution du bruit	36
3.4.2.1 Moyenne des réponses	36
3.4.2.2 Normalisation	36
3.4.2.3 Filtrage spatial	37
3.4.2.4 Analyse en composantes principales	39
3.4.2.5 Stimulation périodique	40
3.5 Mesure de la sélectivité	41
3.5.1 Rétinotopie	41
3.5.2 Orientation	43
3.5.3 Direction	47
4. Objectifs	50

ARTICLE 1	52
ABSTRACT	54
INTRODUCTION	55
METHODS	56
Animal preparation	56
Acquisition and stimulation	57
Offline processing	57
Shuffle analysis and statistic	59
RESULTS	59
Rétinotopic map and “point spread”	59
Response as a function of the stimulus diameter in area 18	60
Response as a function of the stimulus diameter in area 17	63
Interaction between optimal diameters, suppressions values and eccentricity	63
Relationship between optimal diameters and suppressions maps with orientation map	69
Control of the neuronal origin of optimal diameters and suppressions maps	72
DISCUSSION	75
Functional involvement of the surround maps	75
Validity of surround maps	76
Spatial interaction with other cortical maps	76
Comparison with primates	77
Surround parameters estimation	78
Anatomic and functional origin of the signal	79
Point spread delimitation	79
REFERENCES	81
<hr/>	
ARTICLE 2	85
ABSTRACT	87
INTRODUCTION	88
EXPERIMENTAL PROCEDURES	89
Animal preparation	89
Visual stimulation	92
Data acquisition and processing	92
RESULTS	99
Direction selectivity	100
Spatial frequency maps	103
Orientation domain characteristics	106
DISCUSSION	109
Technical considerations	109
Signal amplitude	110
Direction selectivity	110
Spatial frequency organization	112
Spatial spread of activity	113

Functional considerations	114
REFERENCES	115

ARTICLE 3a	122
ABSTRACT	124
INTRODUCTION	125
METHODS	126
Signal model	126
Response model	128
Hemodynamic response estimation	134
Animal preparation	135
Acquisition and stimulation	136
Offline pre-processing and episodic analysis	137
RESULTS	138
Rétinotopic mapping of the visual cortex	138
HRF estimation	142
pRF estimation	147
DISCUSSION	153
Rétinotopic mapping by single harmonic analysis	154
Hemodynamic response and noise	154
Response bandwidth by multiple harmonics analysis	156
Conclusion and future directions	158
APPENDIX A	159
APPENDIX B	161
SUPPLEMENTARY MATERIAL	162
REFERENCES	168

ARTICLE 3b	172
ABSTRACT	174
INTRODUCTION	175
METHODS	177
Model	177
Animal preparation	180
Acquisition and stimulation	182
Offline pre-processing and episodic analysis	183
RESULTS	185
First and second harmonics to evaluate direction and orientation selectivity	185
Fractures in direction map	194
Measures of direction selectivity	194
Demonstration of versatility of the bimodal modulation: measures of monocular and binocular responses	202
DISCUSSION	204
Periodic stimulation	205

Information carried by harmonics	206
Direction selectivity	207
Binocularity	209
Conclusions	210
REFERENCES	211

DISCUSSION	216
5. Sommaire des résultats	217
5.1 Carte de modulation par le pourtour dans le cortex visuel primaire	217
5.2 Cartes fonctionnelles dans l'aire 21a	218
5.3 La stimulation continue pour révéler la réponse hémodynamique, la taille des champs récepteurs et la sélectivité à la direction	218
6. Considérations techniques	221
6.1 Choix du modèle et de la préparation	221
6.2 La mesure du signal en imagerie optique	223
6.2.1 De quel compartiment fonctionnel provient le signal ?	223
6.2.2 Quelles sont les alternatives à l'imagerie des signaux intrinsèques ?	225
6.2.3 De quelles couches corticales proviennent les signaux ?	230
6.2.4 Pourquoi y a-t-il une réponse hémodynamique ?	231
6.3 Le gain apporté par la nouvelle avenue de la stimulation continue	233
6.3.1 La stimulation continue ne peut pas extraire tout le bruit	233
6.3.2 Normalisation	236
6.3.3 Résolution spatiale et polaire	236
6.3.4 Estimation de la réponse hémodynamique et de la taille des champs récepteurs.	238
6.3.5 Estimation de la direction et de l'orientation	242
6.3.6 Simulation continue : application à d'autres modalités	243
6.3.6.1 Cartographie unimodale	243
6.3.6.2 Estimation de la largeur de bande	245
6.3.6.3 Cartographie bimodale	246
7 Implications fonctionnelles	247
7.1 Analyse de l'orientation et de la forme	247
7.2 Analyse de la direction	250
7.3 Analyse centre / pourtour	252
7.4 Rôle et origine des cartes	254
7.5 Études futures	256
7.5.1 Lésions réversibles	256
7.5.2 Mise en évidence d'une organisation corticale pour la direction dans le PMLS	259
7.5.3 Carte d'orientation dans l'aire 21a	262
CONCLUSION	263
SOURCES DOCUMENTAIRES	264

ANNEXE	xviii
8.1 Matériels supplémentaires	xix
8.2 Organisation fonctionnelle du cortex visuel du toupaye	xxix
8.2.1 Mise en contexte	xxix
8.2.2 Évaluation de la fréquence spatiale	xxix
8.2.3 Absence de carte d'orientation dans l'aire V2	xxx
8.2.4 Absence de carte de direction dans l'aire V1	xxxi
8.3 Organisation fonctionnelle du cortex visuel chez le lapin	xxxv
8.4 Impact des récepteurs CB1 aux endocannabinoïdes sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel de la souris et le couplage hémodynamique	xxxvii
8.4.1 Mise en contexte	xxxvii
8.4.2 Couplage neurovasculaire	xxxviii
8.4.3 Sensibilité au contraste et sélectivité à la fréquence spatiale	xl
8.4.4 Organisation rétinotopique	xl
8.5 Cartes corticales chez le rat	xliv
ABSTRACT	xlvi
INTRODUCTION	xlvii
MATERIAL AND METHODS	xlviii
RESULTS	lii
DISCUSSION	lix
8.6 Stimulations planes	lxiv
8.7 Références	lxvii

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Connectivité cortico-corticale et couche laminaire	4
Figure 2. Connectivité cortico-corticale chez le chat	5
Figure 3. Voie ventrale et dorsale chez le chat	7
Figure 4. Le cortex visuel du chat	8
Figure 5. Organisation rétinotopique	10
Figure 6. Complexe Latéral-Postérieur	14
Figure 7. Population de champs récepteurs	17
Figure 8. Cartes d'orientation et de direction	18
Figure 9. Regroupement spatial des paramètres	20
Figure 10. Carte de fréquence spatiale	23
Figure 11. Carte de suppression par le pourtour	25
Figure 12. Uniformité de recouvrement	27
Figure 13. Mesure des variations du volume sanguin	30
Figure 14. Spectre d'absorption de l'hémoglobine	31
Figure 15. Spectrométrie et mesure de l'oxygénation de l'hémoglobine	33
Figure 16. Dispositif d'enregistrement	35
Figure 17. Méthodes de réduction du bruit spatial	38
Figure 18. Rétinotopie du cortex de la souris mesurée par stimulation épisodique	42
Figure 19. Paradigme de stimulation continue	44
Figure 20. Rétinotopie du cortex de la souris mesurée par stimulation périodique	45
Figure 21. Cartes d'orientation dans le cortex du souris mesurées par stimulation périodique	48
Figure 22. Mesure de la sélectivité à l'orientation et à la direction	49

ARTICLE 1

Figure 1. Visuotopic map and "point spread".	61
Figure 2. Spread of activation as a function of the diameter.	64
Figure 3. Response to varying stimulus diameters.	65
Figure 4. Optimal diameters and suppressions maps.	66
Figure 5. Responses in area 17 to increasing stimulus sizes.	67
Figure 6. Optimal diameters and suppressions values.	70
Figure 7. Relationship between optimal diameters and suppressions map with orientation map.	71
Figure 8. Neuronal origin of optimal diameters or suppressions maps .	74

ARTICLE 2

Figure 1.	91
-----------	----

Figure 2.	98
Figure 3.	101
Figure 4.	102
Figure 5.	104
Figure 6.	105
Figure 7.	108

ARTICLE 3a

Figure 1.	133
Figure 2.	140
Figure 3.	141
Figure 4.	144
Figure 5.	145
Figure 6.	146
Figure 7.	148
Figure 8.	149
Figure 9.	150
Figure 10.	152
Figure supplémentaire 1.	163
Figure supplémentaire 2.	164
Figure supplémentaire 3.	165
Figure supplémentaire 4.	166
Figure supplémentaire 5.	167

ARTICLE 3b

Figure 1.	181
Figure 2.	186
Figure 3.	190
Figure 4.	192
Figure 5.	193
Figure 6.	195
Figure 7.	196
Figure 8.	198
Figure 9.	201
Figure 10.	203

DISCUSSION

Figure 23. Cartes corticales et phylogénie	225
Figure 24. Autofluorescence des flavoprotéines	227
Figure 25. Colorants sensibles au calcium	229
Figure 26. Variations spécifiques et non-spécifiques de l'oxygénation	232
Figure 27. Mesure de la taille des champs récepteurs	241
Figure 28. Carte tonotopique	244

Figure 29. Carte d'orientation dans l'aire 21a	248
Figure 30. Mesure de la largeur de la réponse en fonction du chevauchement des domaines d'orientation	249
Figure 31. Plasticité de la structure des cartes	253
Figure 32. Rôle du LP-pulvinar	258
Figure 33. Imagerie du PMLS	261

ANNEXES

Figure 34. La mesure d'autofluorescence est majoritairement affectée par l'hémoglobine.	xx
Figure 35. Les ondes de Mayer se synchronisent-elles avec la réponse hémodynamique ?	xxi
Figure 36. Filtrage spatial en imagerie optique.	xxii
Figure 37. Filtrage spatial en imagerie optique (suite).	xxiii
Figure 38. Validation des mesures rétinotopiques en stimulation continue.	xxiv
Figure 39. Mesure de la largeur de bande pour l'orientation en stimulation continue.	xxv
Figure 40. Potentiel de cartographie offert par une chambre d'enregistrement de 5.4 cm ² .	xxvi
Figure 41. Mesure de l'inactivation réversible en imagerie optique.	xxvii
Figure 42. Mesure de la fréquence spatiale à l'aide de la stimulation continue.	xxviii
Figure 43. Fréquence spatiale dans le cortex visuel du toupaye.	xxxiii
Figure 44. Orientation dans le cortex visuel du toupaye.	xxxiv
Figure 45. Organisation fonctionnelle du cortex visuel du lapin.	xxxvi
Figure 46. Influence de CB1 sur le couplage neurovasculaire, la fréquence spatiale et le contraste	xxxix
Figure 47. Influence de CB1 sur la forme et l'amplitude de l'activation rétinotopique	xlii
Figure 48. Influence de CB1 sur l'organisation rétinotopique	xlii
Figure 49.	liii
Figure 50.	lv
Figure 51.	lvi
Figure 52.	lviii
Figure 53. Artefacts de stimulation	lxvi

LISTE DES TABLEAUX**ARTICLE 3b**

Tableau 1.	192
Tableau 2.	198

LISTE DES ABREVIATIONS

2-DG	2-desoxy-glucose
AEV	sulcus ectosylvien antérieur
ALLS	partie antéro-latérale du sulcus suprasylvien latéral
AMLS	partie antéro-médiane du sulcus suprasylvien latéral
C50	Contraste évoquant 50% de la réponse maximum
CB1	récepteur aux Cannabinoïdes de type 1
CGL	Corps Genouillé Latéral
CMRO ₂	taux de consommation métabolique en O ₂
EDI	Index de Direction Épisodique
fMRI	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
GABA	Acide Gamma Amino Butyrique
Hb	Hémoglobine réduite
HbO ₂	Hémoglobine oxygénée
HRF	Fonction de réponse hémodynamique
IRMf	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
KO	souris knock-out
LED	Diode électroluminescente
LGN	Corps Genouillé Latéral
LPI	partie latérale du noyau latéro-postérieur thalamique
LPm	partie médiane du noyau latéro-postérieur thalamique
LP-pulvinar	complexe Latéral Postérieur du pulvinar
MT	aire Médio-Temporale
OCT	Tomographie de Cohérence Optique
PDI	Index de Direction Périodique
PLLS	partie postéro-latérale du sulcus suprasylvien latéral
PMLS	partie postéro-médiane du sulcus suprasylvien latéral
pRF	population de champs récepteurs
RDK	kinématogramme de points distribués aléatoirement
RF	champ récepteur
ROI	Région d'intérêt
SF	Fréquence spatiale
SFo	Fréquence Spatiale optimale
SNR	rapport signal / bruit
TD	aire Dorso-Temporale
V1, V2, ...	aires visuelles primaire, secondaire, ...

Les yeux sont inutiles à un cerveau aveugle

vieux proverbe arabe

REMERCIEMENTS

Bon, c'est mon 5^e hiver au Québec et je suis toujours vivant. Je vais peut être rester un peu plus longtemps que je pensais finalement. Bon attendant, il paraît qu'il faut couper le cordon et passer à autre chose. Donc c'est peut être le temps de remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler comme si on allait ne plus jamais les revoir. Mais bon, c'est les conventions, c'est comme ça, et vu que je suis particulièrement expressif ça va être un plaisir.

Merci Christian pour m'avoir accueilli et pour avoir quand même pas mal transformé ma façon d'appréhender la recherche. Finalement, aujourd'hui j'apprécie peut être un peu mieux cette expression de « jeter le bébé dans l'eau ». Merci pour ne jamais avoir freiné mes idées, mêmes les plus hasardeuses (l'essentiel de mes idées en fait...). Merci pour ta confiance et la liberté de travailler que tu offres. Et évidemment, merci pour ta bonne humeur et ton sens de l'humour quand tu n'as pas mal au dos, au ventre, à la tête, aux cheveux, à la gorge ou à la cheville.

Merci Frédéric pour m'avoir fait découvrir le côté obscur de l'imagerie optique. Ta rencontre a permis à mon travail de prendre un tournant que je n'avais pas prévu initialement et que je ne regrette pas d'avoir pris. J'ai beaucoup apprécié les rencontres que j'ai pu faire dans ton lab. Un peu moins, les discussions se traduisant par des séries d'équations incompréhensibles... Un jour il va falloir que je m'y mette quand même.

Merci à ma petite famille, Caroline, maintenant que j'y pense ce n'était peut être pas une si bonne idée de rédiger et de soutenir nos thèses exactement en même temps. Je crois vraiment qu'on est des mauvais parents (pauvre Méline...) Merci pour toute ta compréhension lors des longues soirées, des longues semaines d'expérience. J'ai une bonne nouvelle, ce n'est pas prêt de s'améliorer...

Merci à tous les aventuriers de l'imagerie optique. Martin, pour m'avoir introduit dans cette secte et de m'avoir montré comment rester zen devant les multiples bugs de VDAQ et surtout d'avoir partagé avec moi ces passions communes que sont *la taxidermie sur crâne de petit animal* ou *l'imagerie corticale systématique du règne animal*. Merci pour toutes ces interactions qu'on a pu avoir et d'avoir supporté mes multiples mise-à-jour de la toolbox du lab (OIA_fitGauss_modif2b_correction3.m ça fait juste la même chose que la version *correction2c mais ça ne plante pas exactement au même endroit). Samuel, j'ai vraiment bien apprécié ta présence dans le lab (même si ce n'était qu'une fois par mois en moyenne). Merci pour ton sens de l'humour sans limite, vraiment sans limite et pour embarquer avec enthousiasme avec moi sur des projets bizarres. Karine, merci pour ta volonté de vouloir faire de l'imagerie optique et te mettre à Matlab en parallèle de la microscopie, de l'électrophysiologie, de l'imagerie de la rétine et des consultations psychologiques pour étudiants anxieux, et le tout, à mi-temps. Merci Céline pour l'excellente année que j'ai passée à travailler avec toi et tes souris. Merci pour ta bonne humeur et désolé de t'avoir fatigué à te faire croire que « le PhD c'est vraiment bien ». Marianne, courage, tu vas y arriver ! On est les meilleurs !... (C'est moi qui dit ça ?). Merci à tous les autres membres du labo. Brian, qui incarne le scientifique et le buveur que tout le monde rêve de devenir un jour. J'ai pu apprécier de voir que je n'étais pas le seul à avoir une addiction pour les stimuli bizarres, le café et matlab.

Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir, un feutre à la main, à inonder les fenêtres de schémas, faute de tableau... Merci Geneviève pour nous rendre la vie plus facile et pour m'avoir aidé à comprendre certaines expressions québécoises lors de mon arrivée. Merci Marilyse pour ta bonne humeur et pour m'avoir soutenu dans l'élaboration de la plus haute pyramide en tasse à café « Starbucks » jamais construite. Merci Nawal pour ton sens critique et tes remarques précieuses que tu n'hésites pas à partager, merci aussi pour ton contrôle calorique de tout les instant ! Je vivrais plus vieux grâce à toi ! Merci Mélissa pour m'avoir initié au poker et ruiné, Jonathan, pour avoir donné vie à la bête, Frédéric H., pour l'idée de la perfusion à l'huile d'olive et finalement aux étudiants d'été et en particulier Nicolas et Bertrand, pour avoir subis mes commentaires dans le développement de StimPlus.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu croiser à l'École d'Optométrie. Entre autre, Maurice et les personnes de son lab. Merci au deux papas, Antoneh et Sebastien, par deux et trois fois, vous m'avez largement battu les gars... Jean-François, pour avoir accepté de présider ma thèse mais aussi pour ta disponibilité, Elvire, pour ta porte ouverte à toutes mes questions. Merci évidemment à toutes les personnes des autres labs (il m'aurait fallu plus de pages...). Merci à François pour avoir embarqué sur les 1000 pièces à usiner d'urgence pour hier matin. (Comment vont les cages au fait ?...) Merci aux nomades du 3^e étage, Marc et mes 1000 problèmes informatiques, Denis et ses 1000 raccourcis clavier CS-Adobe, Micheline et mes 1000 courts-circuits. Merci enfin au personnel du secrétariat et aux vigiles de Roy Sécurité.

Merci à toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer lors de ma thèse. Les membres du lab de Frédéric à Poly et en particulier Jean pour les interactions lucratives qu'on a pu avoir. Woody Petry et Martha Bickford et leurs mémorables dîners du « Pulvinar » sans lesquels je n'aurais par exemple jamais su que le toupaye est un plat typique en Indonésie. Frédéric Chavane et Stéphane Molotchnikoff qui ont, entre autre, accepté d'arbitrer ma thèse. Kaare Christian, qui, malgré la médiocre qualité des équipements vendus à prix d'or par Optical Imaging Inc. a toujours été à mon écoute efficacement. Jérôme Ribot, dont l'avis à souvent été très utile à plusieurs étapes des projets. Yves Frégnac, sans qui je ne serais probablement pas allé chez Christian. David Fitzpatrick pour m'avoir permis de ressentir toute la gamme d'émotion possible en moins de 15 min. Merci à Alice Guyon, Daniel Eugène, Pierre Vincent et Jean Devars pour m'avoir permis de trouver ma voie. Merci enfin à Maltab et à la bête avec qui j'ai passé de très bons moments. Pour finir, je ne dirais évidemment pas ce que je pense de la DGTIC.

Enfin, merci aux différents contributeurs financiers sans qui j'aurais eu à manger bien pire que du toupaye. Les IRSC, le CRNSC et le NIH par le biais de Christian. Merci également au ministère des affaires étrangères du gouvernement du Canada, à la faculté des études supérieures, à l'école d'optométrie et à la faculté de médecine de l'université de Montréal pour les différents aides qu'ils ont pu m'apporter. Merci aussi au réseau de recherche en santé de la vision (FRSQ) et au groupe de recherche en science de la vision (GRSV) pour les opportunités qu'ils offrent aux étudiants de présenter leurs travaux.

INTRODUCTION

Tout comme pour les autres modalités sensorielles, la vision peut avoir des rôles multiples selon les espèces : elle permet de se localiser, de se déplacer, d'identifier sa nourriture ou un danger, de communiquer, etc.... La perception visuelle implique donc deux grandes catégories d'analyse : l'*identification* et la *localisation* dans l'espace et le temps. L'étude des mécanismes cérébraux permettant ces analyses a en grande partie été rendue possible grâce à l'expérimentation animale. Malgré sa distance génétique importante avec l'homme, le chat a rapidement représenté un très bon modèle au sein des mammifères. Tout comme l'homme, c'est en effet un animal dont la vision est très développée mais qui offre des contraintes logistiques moins importantes qu'en utilisant les primates non humains tels que le macaque. L'ensemble des études présentées dans cette thèse a été réalisé sur le chat. L'emphase sera donc mise sur ce modèle dans la suite de cette introduction.

1 Les voies visuelles chez le chat

1.1 De la rétine au cortex

Chez tous les mammifères, lorsque l'image arrive sur la rétine, les photons sont transcodés en impulsions neuronales qui sont transférées via les axones des cellules ganglionnaires principalement dans les deux structures visuelles du cerveau : le corps genouillé latéral (CGL) et le collicule supérieur. Tout comme chez les primates, l'analyse de l'*identification* ou de la *localisation* chez le chat se sépare de manière très précoce dans le système visuel au niveau du capteur lui-même : la rétine. Deux principaux types de cellules ganglionnaires y sont présentes : les cellules X, ayant de petits champs récepteurs et peu sensibles au contraste et les cellules Y, ayant de plus grand champs récepteurs et beaucoup plus sensibles au contraste (Enroth-Cugell et Robson, 1966). Il en découle l'hypothèse que le canal X serait plus impliqué dans l'identification alors que le canal Y serait plus impliqué dans l'analyse du mouvement. Il est à noter qu'un troisième canal, W est également identifié mais ses caractéristiques et son rôle sont beaucoup moins clair que pour les canaux X et Y.

Cette catégorisation est par la suite respectée par les axones des cellules ganglionnaires qui se projettent dans différentes couches du CGL (i.e. principalement couches A, A1 et C chez le chat). Alors que les couches A et A1 sont constituées d'un mélange de cellules X et Y, la couche C est elle

majoritairement constituée de cellules Y. Tout comme les champs récepteurs des cellules ganglionnaires de la rétine, ceux des neurones du CGL sont circulaires et généralement non sélectif à l'orientation des stimuli. En plus de cette organisation anatomo-fonctionnelle des projections X et Y dans le CGL, il existe une organisation rétinotopique et oculaire dans les couches du CGL. Chaque couche est une représentation topographique de la rétine (et donc du champ visuel) et correspond aux projections d'un seul des deux yeux : les couches A et C reçoivent les projections de l'œil contra-latéral alors que la couche A1 reçoit des projections de l'œil ipsi-latéral.

Toutes les couches du CGL projettent ensuite leurs axones vers le cortex visuel primaire (i.e. aires 17, 18 et 19 chez le chat). De plus, les cellules de la couche C se projettent également vers d'autres cibles telles que dans le cortex du sulcus suprasylvien où se trouvent des aires de plus haut niveau hiérarchique (LeVay et Gilbert, 1976, Leventhal, 1979, Tong et al., 1982). Les canaux jusqu'ici parallèles auront tendance à se séparer à ce niveau : alors que l'aire 17 revoit en effet des projections des cellules X et Y, l'aire 18 ne reçoit par contre que des projections des cellules Y (Stone et Dreher, 1973, Freund et al., 1985, Humphrey et al., 1985b, a).

Les axones des cellules du CGL se connectent principalement aux neurones de la couche IV du cortex. Par la suite, les cellules de la couche IV établissent des connexions avec les cellules des autres couches corticales (couches supérieures : II/III, et inférieures : V et VI). Les cellules des couches inférieures établissent alors des connexions avec des structures sous-corticales (e.g. couche V : pulvinar, couche VI : CGL). Les cellules des couches supérieures établissent elles, des connexions avec d'autres neurones de la même couche (on parle alors de connexions latérales) ou avec des cellules de la couche IV de structures corticales de plus haut niveau hiérarchique (connexion « feedforward »). Dans ces structures de plus haut niveau, les neurones peuvent également établir des connexions avec les neurones des structures de plus bas niveau (rétrocontrôle, voir pour revue Bullier, (2004)).

La figure 1 montre qu'il semble donc exister un motif anatomique récurrent dans les connectivités cortico-corticales et cortico-thalamo-corticale. En se basant entre autre sur ce motif (Scannell et al., 1995) ont proposé une organisation hiérarchique des aires corticales chez le chat. La figure 2 montre que les aires

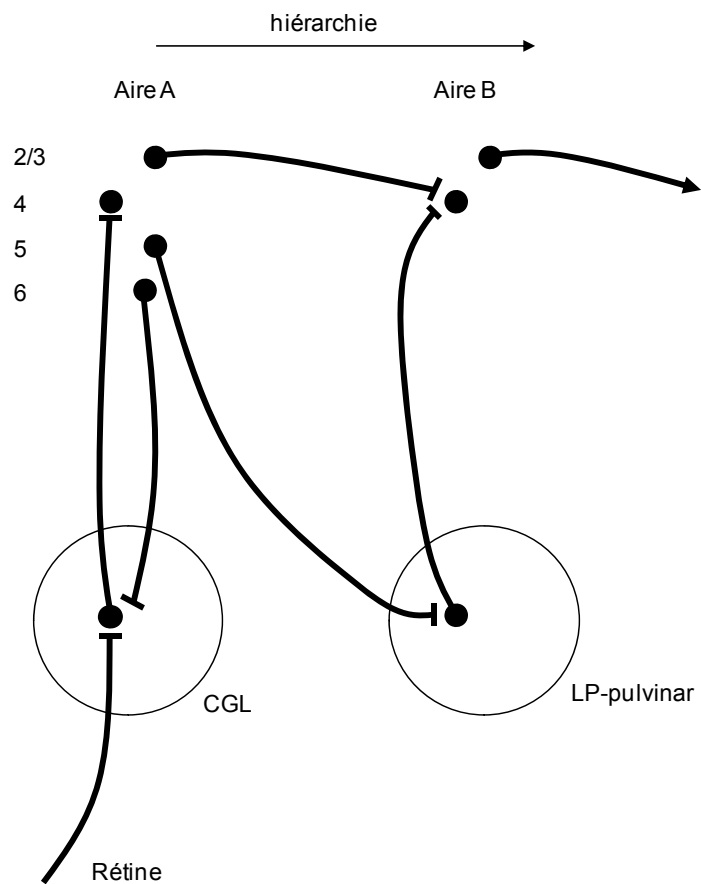


Figure 1. Connectivité cortico-corticale et couche laminaire

Motif de la connectivité cortico-corticale et cortico-thalamo-corticale des projections montantes. Adaptée de Bullier (2004).

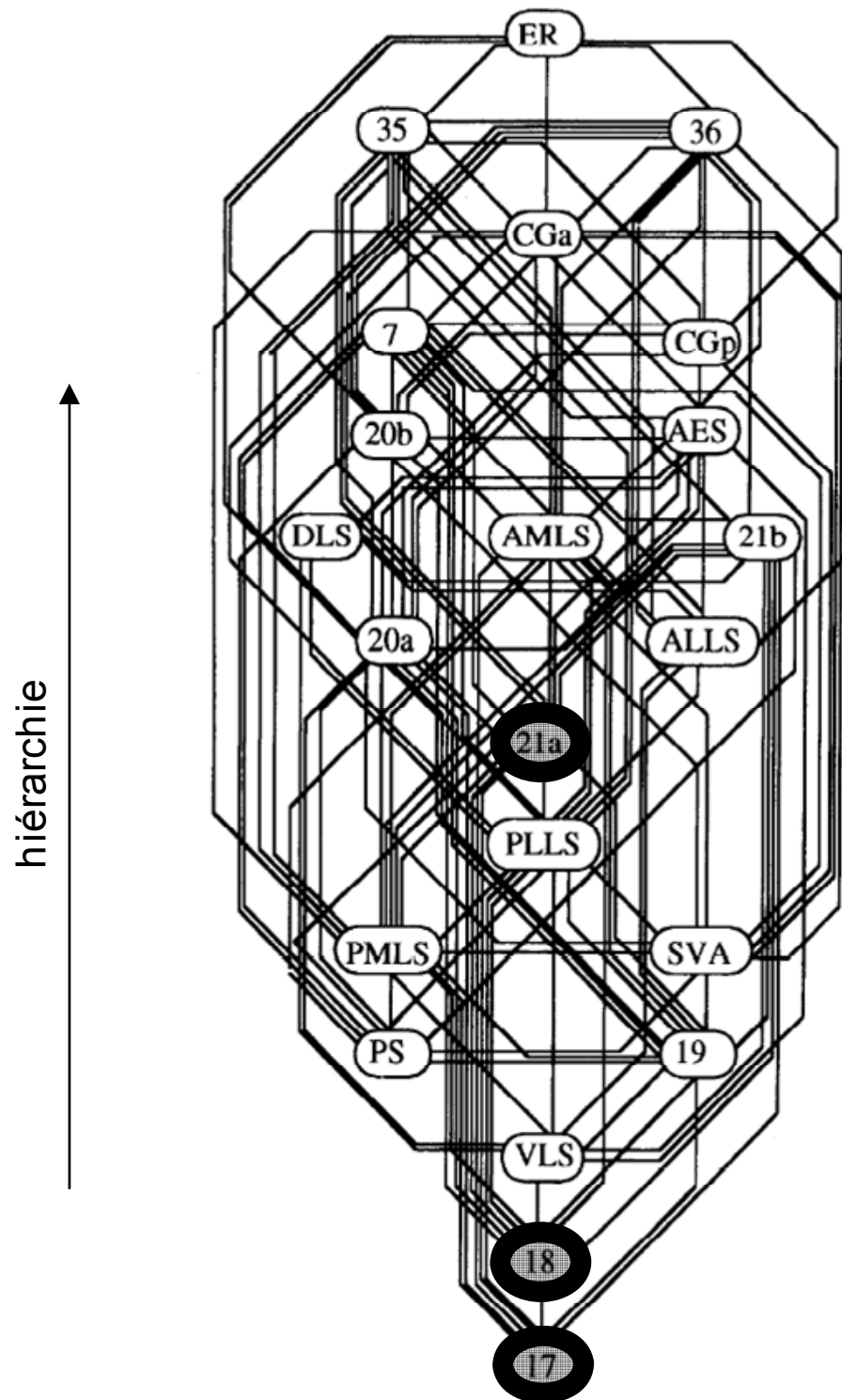


Figure 2. Connectivité cortico-corticale chez le chat

Diagrammes des connexions existant entre les aires corticales chez le chat. Les aires étudiées dans cette thèse sont indiquées par les cercles noirs. Adaptée de Scannel et al. (1995).

visuelles primaires (e.g. aires 17 et 18) se trouvent à un plus bas niveau par rapport à certaines autres telles que le PMLS ou l'aire 21a.

En évaluant des tâches comportementales suite à des inactivations réversibles de différentes zones du cortex, Lomber (2001) a pu identifier la contribution de ces aires corticales de plus haut niveau dans des analyses reliées soit à l'*identification* ou à la *localisation* (figure 3). Il a ainsi pu révéler que les aires temporales et postérieures telles que l'aire 21a, dominées par projection de l'aire 17, étaient impliquées dans des processus d'identification. Les structures pariétales et antérieures quant à elles, telles que PMLS, dominées par les entrées de l'aire 18, semblaient plus impliquées dans des processus d'analyse du mouvement.

Tout comme cela avait déjà été révélé chez les primates (Ungerleider et Mishkin, 1982), deux voies corticales d'analyse semblent donc exister chez le chat : la voie ventrale majoritairement dominée par les projections de type X (la voie du « quoi ») et la voie dorsale, dominée par les projections de type Y (la voie du « où »). Les canaux X et Y, parallèles de la rétine jusque dans le cortex visuel primaire bifurquent donc dans les aires de plus haut niveau qui se spécialisent dans chacune des deux grandes catégories d'analyse visuelle. La figure 4 schématise la localisation des aires corticales d'intérêt (aires 17, 18 et 21a) et leur implication dans ces deux voies. Il est à noter que cette ségrégation fonctionnelle observée ici chez le chat est encore plus accentuée chez les primates.

1.2 Le cortex visuel primaire

Chaque neurone du cortex visuel primaire reçoit des projections de plusieurs cellules du CGL dont les champs récepteurs sont organisés en lignes dans le champ visuel. Cette architecture, rend les neurones du cortex sensibles à l'orientation des stimuli (Hubel et Wiesel, 1962, Reid et Alonso, 1995, Ferster et Miller, 2000). En plus, d'autres mécanismes, tels que des rétrocontrôles des aires de plus haut niveau comme par exemple ceux de l'aire 21a, participent également au renforcement de la sélectivité à l'orientation (Huang et al., 2004, Wang et al., 2000, 2007). La sélectivité à l'orientation dans le cortex visuel primaire est une des propriétés les plus conservées entre les mammifères. Chez le chat et les primates, en chaque point du cortex, la même préférence à l'orientation est observée dans toutes les couches corticales. Cette notion de « colonne corticale » sera détaillée plus en détail dans le chapitre 2.

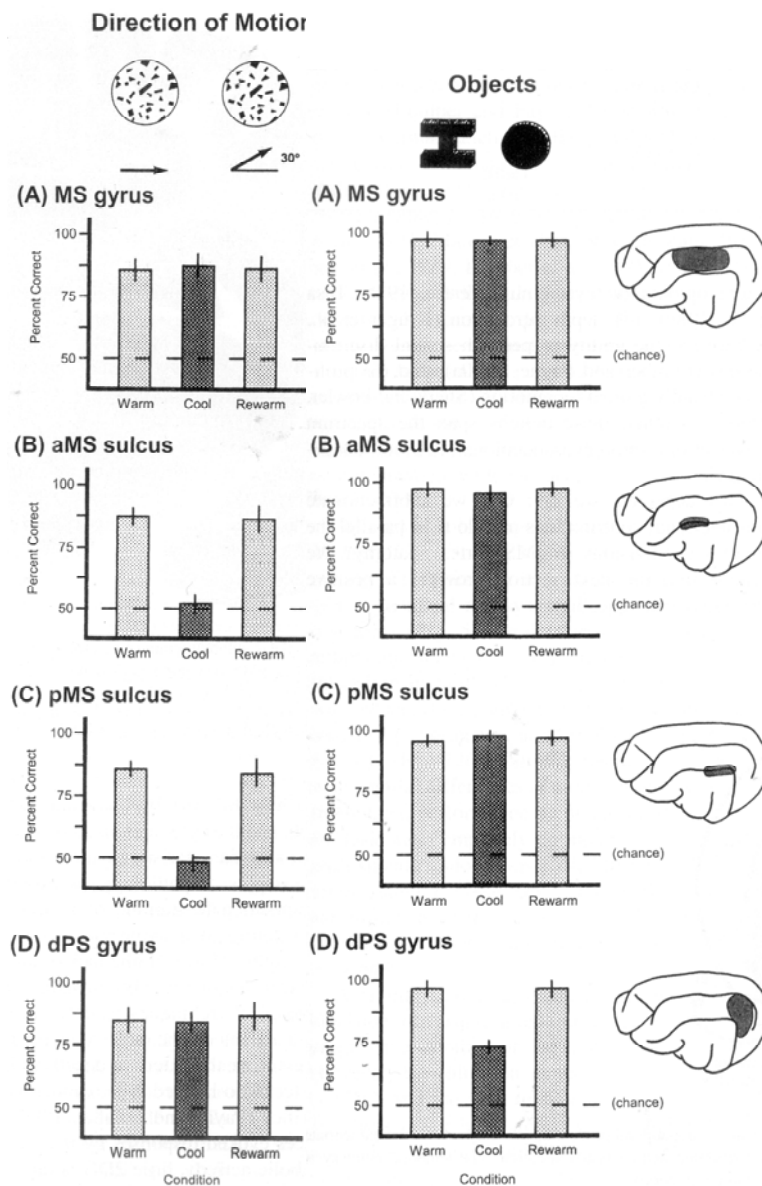


Figure 3. Voie ventrale et dorsale chez le chat

Effet de l'inactivation réversible de quatre portions du cortex du chat (à droite) sur des tâches comportementales de perception du mouvement (à gauche) ou de reconnaissance des formes (au centre). La zone noire en (C) implique l'inactivation du PMLS, alors que la zone en (D) implique l'inactivation de l'aire 21a. Adaptée de Lomber (2001).

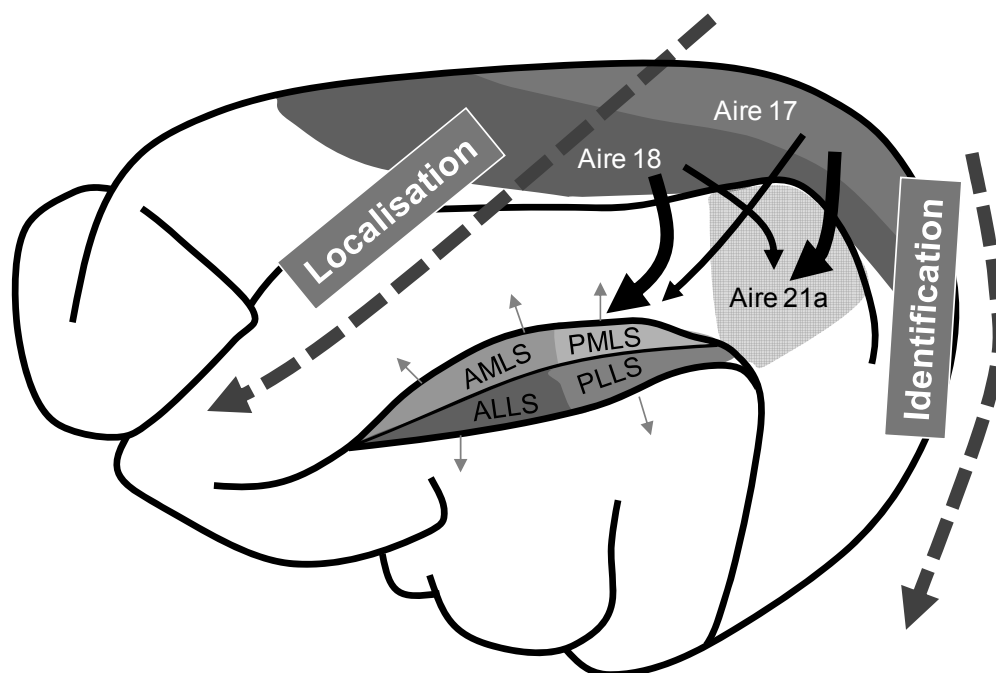


Figure 4. Le cortex visuel du chat

Localisation des aires corticales étudiées dans cette thèse (aires 17, 18 et 21a) et leur participation aux processus de la voie ventrale (*identification*) ou dorsale (*localisation*). Inspirée de Lomber (2001).

Les cellules du cortex visuel primaire du chat sont également très sélectives à la direction et ce, dans toutes les couches corticales contrairement à d'autres espèces de mammifères (Gilbert, 1977, Van Hooser, 2007). Il est à noter que les neurones de l'aire 18, qui reçoivent uniquement des projections du canal Y, sont plus sélectifs à la direction que ceux de l'aire 17 (Orban et al., 1981). Les mécanismes permettant d'élaborer la sélectivité à la direction dans le cortex visuel primaire sont complexes et semblent impliquer, entre autre, des boucles de rétrocontrôle avec des aires de plus haut niveau de la voie dorsale, impliquées dans l'analyse du mouvement (e.g. PMLS, voir section 1.3). Différentes études ont en effet montré que l'inactivation réversible du PMLS provoquait une diminution de la sélectivité à la direction dans les aires 17 et 18 (Galuske et al., 2002, Shen et al., 2006).

La figure 5 montre qu'en plus de s'organiser de manière à permettre l'analyse de l'orientation, les projections du CGL s'organisent visuotopiquement dans le cortex visuel primaire (Tusa et al., 1979, Tusa et al., 1978, Albus et Beckmann, 1980). Ainsi, chaque neurone ne répond que lorsqu'on présente le stimulus dans son champ récepteur et ce, pour une orientation précise. Les tailles des champs récepteurs augmentent avec l'excentricité et elles sont généralement plus petites dans l'aire 17 que dans l'aire 18.

Un stimulus présenté hors du champ récepteur ne peut pas induire de réponse mais peut par contre moduler la réponse évoquée par une stimulation dans le champ récepteur (Gilbert, 1977, Akasaki et al., 2002, Fitzpatrick, 2000, Levitt et Lund, 1997, Polat et al., 1998, DeAngelis et al., 1994, Cavanaugh et al., 2002a, b, Sengpiel et al., 1997, Allman et al., 1985).

La modulation des réponses issues par la stimulation du centre par le pourtour peut être de nature facilitatrice ou inhibitrice selon les conditions d'orientation, de contraste ou de fréquence spatiale. D'une façon générale, l'effet inhibiteur est maximum lorsque l'orientation et la fréquence spatiale du pourtour sont les mêmes que ceux du neurone. L'effet de la modulation dépend également du contraste du stimulus dans le champ récepteur. A haut contraste, la modulation par le pourtour est souvent inhibitrice et peut devenir facilitatrice à plus bas contraste (Levitt et Lund, 1997, Polat et al., 1998, Toth et al., 1996). L'étendue du pourtour modulateur est également augmentée à plus bas contraste (Sengpiel et al., 1997). Cette influence du contraste pourrait être un mécanisme permettant d'augmenter la détection des contours lorsque le signal est faible ou que son gain doit être

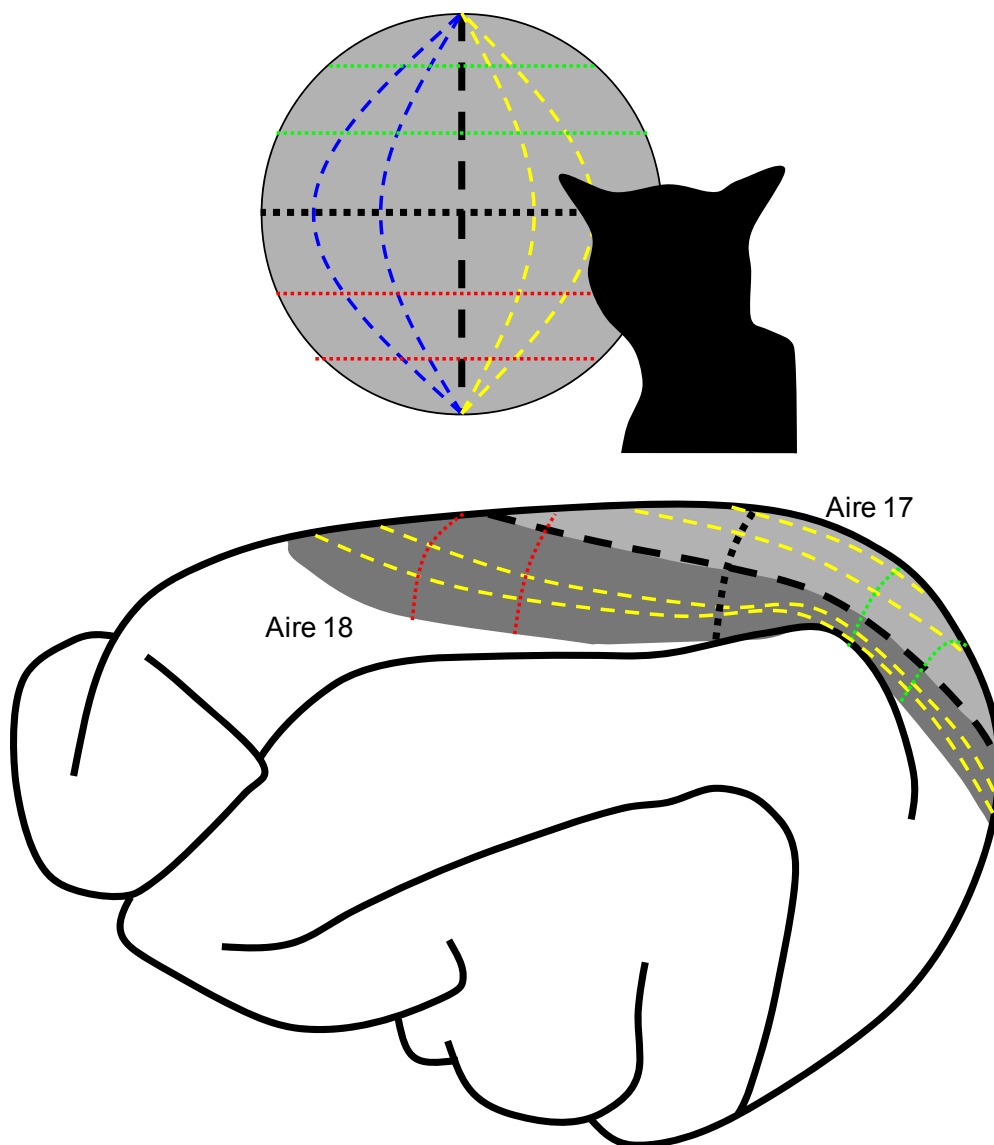


Figure 5. Organisation rétinotopique

Schéma de l'organisation rétinotopique dans les aires 17 et 18 du chat. Inspirée de Tusa et al. (1978, 1979).

maximisé (Sceniak et al., 1999). Cette théorie est d'ailleurs en accord avec l'extension des limites du pourtour observée dans le cas de stimuli plus complexes ou dans des processus impliquant l'attention visuelle (Kapadia et al., 1999, Ito et Gilbert, 1999).

Les mécanismes complexes de cette modulation ne sont pas complètement élucidés, mais semblent impliquer une combinaison d'effets provenant de l'organisation dans les projections du CGL, des rétrocontrôles des aires de plus haut niveau et d'interactions locales intra-corticales (Durand et al., 2007, Angelucci et al., 2002, Ozeki et al., 2004, Naito et al., 2007, Wielaard et Sajda, 2006, Toth et al., 1996, Das et Gilbert, 1995). Ces interactions intra-corticales sont classées en deux catégories : les *connexions courtes* (~0.5mm) qui établissent des relations avec tous les neurones environnants indépendamment de leur sélectivité et les *connexions longues* (quelques mm) qui établissent des jonctions avec des neurones d'orientations similaires (Bosking et al., 1997, Malach et al., 1993, Gilbert et Wiesel, 1989).

Pour permettre les interactions centre/pourtour, les champs récepteurs des neurones connectés via ces interactions intra-corticales doivent a priori ne pas trop se chevaucher pour intégrer des portions de l'espace visuel suffisamment distantes (Fitzpatrick, 2000). Ainsi les connexions longues semblent représenter le substrat idéal car la longue distance de leurs projections implique des champs récepteurs suffisamment éloignés.

Toutefois, il est à noter qu'au niveau des « pinwheels » de la carte d'orientation (i.e. région du cortex où la sélectivité à l'orientation des neurones est hétérogène, voir chapitre 2.1.2), des sauts importants dans la position des champs récepteurs ont pu être observés dans l'aire 17 du chat par Das et Gilbert (1997). Ainsi, dans certains cas, les connexions courtes pourraient également apporter des informations provenant de champs récepteurs distants. Malgré tout, il est à noter que des études plus récentes réalisées chez le chat (Buzas et al. 2003) et chez le toupaye (« tree shrew », Bosking et al. 2002) ont au contraire démontré que la carte de rétinotopie était indépendante de la carte d'orientation

1.3 La voie dorsale

La structure de la voie dorsale la mieux caractérisée chez le chat est l'aire postéro-médiale du sulcus suprasylvien latéral (PMLS). Elle reçoit des afférences du

cortex visuel primaire (e.g. aires 17 et 18) mais aussi de la couche C du CGL (Scannell et al., 1995, Scannell et al., 1999, Grant et Hilgetag, 2005, Grant et Shipp, 1991, Shipp et Grant, 1991, Einstein et Fitzpatrick, 1991, Norita et al., 1996, Henry et al., 1978, Symonds et Rosenquist, 1984a, b). Les neurones de cette structure établissent également des connexions avec le noyau latéral postérieur (LP, voir chapitre 1.5 (Berson et Graybiel, 1978, Huppe-Gourgues et al., 2006, MacNeil et al., 1997, Norita et al., 1996, Raczkowski et Rosenquist, 1983, Tong et al., 1982))

Tout comme dans l'aire MT, son analogue chez les primates (Payne, 1993), les neurones du PMLS sont très sensibles au mouvement. (Brosseau-Lachaine et al., 2001, Vajda et al., 2004, Villeneuve et al., 2006, von Grunau et Frost, 1983, Spear, 1991, Blakemore et Zumbroich, 1987, Merabet et al., 2000). Toutefois, contrairement à des structures de plus haut niveau telles que l'aire antéro médiale du sulcus suprasylvien latéral (AMLS) ou l'aire visuelle antérieure du sulcus ectosylvien (AEV), les neurones du PMLS ne peuvent pas intégrer la direction globale de certains mouvements complexes tels que les *plaid*s (Gizzi et al., 1990, Scannell et al., 1996, Ouellette et al., 2004, Villeneuve et al., 2006). Par contre, tout comme dans le cortex visuel primaire, des phénomènes de modulation centre/pourtour existent dans les neurones du PMLS (von Grunau et Frost, 1983) ainsi que dans son analogue, l'aire MT, où une organisation spatiale pour cette propriété a même été révélée (voir section 2.1.6, (Allman et al., 1985, Born, 2000, Born et Tootell, 1992)).

1.4 La voie ventrale et l'aire 21a

Une grande partie de l'information de la voie ventrale implique l'aire 21a, localisée dans le cortex suprasylvien (Palmer et al., 1978, Tusa et Palmer, 1980). L'étendue de sa rétinotopie correspond essentiellement à la partie centrale du champ visuel. Elle reçoit ses entrées du cortex visuel primaire (Dreher et al., 1996a, Dreher et al., 1996b, Grant et Hilgetag, 2005, Montero, 1981, Shipp et Grant, 1991, Symonds et Rosenquist, 1984b, a, Conway et al., 2000, Stewart et al., 2000) mais également du LP-pulvinar (Symonds et al., 1981, Abramson et Chalupa, 1985, Raczkowski et Rosenquist, 1983, Shipp et Grant, 1991).

Ce sont ces connexions avec le LP-pulvinar (un noyau impliqué dans l'analyse du mouvement, voir chapitre 1.5), certaines similitudes anatomiques avec le PMLS

(Grant et Shipp, 1991, Montero, 1981) et la présence de cellules sélectives à la direction (Dreher et al., 1993, Dreher et al., 1996b) qui ont tout d'abord catégorisé l'aire 21a comme une structure impliquée dans l'analyse du mouvement. Néanmoins, une majorité d'études ont montré que les neurones de cette aire avaient plutôt une faible sélectivité à la direction (Dreher et al., 1993, Dreher et al., 1996b, Mizobe et al., 1988, Morley et Vickery, 1997, Tardif et al., 1996, Toyama et al., 1994, Wang et Dreher, 1996, Wimborne et Henry, 1992). De plus, les neurones de l'aire V4, considérée comme l'homologue de l'aire 21a chez les primates (Payne, 1993) ne présentent pas non plus une forte sélectivité aux mouvements (Desimone et Schein, 1987, Tolia et al., 2005).

Les neurones de l'aire 21a sont par contre très sensibles à l'orientation des stimuli et les techniques d'inactivation réversible ont montré une forte implication de cette structure dans les tâches de reconnaissance des objets sans impact sur la perception du mouvement (Lomber, 2001). Ces propriétés démontrent donc que cette structure est nettement impliquée dans les processus de la voie ventrale. Cette catégorisation est de plus supportée par l'influence de ses rétrocontrôles sur le cortex visuel primaire. En effet, contrairement au PMLS, l'inactivation réversible de l'aire 21a a produit une diminution de la sélectivité à l'orientation sans affecter la sélectivité à la direction (Wang et al., 2000).

Pour finir, contrairement à l'aire 17, sa source d'entrée principale, les champs récepteurs des neurones de l'aire 21a sont plus grands et leur fréquence spatiale optimale, plus basse (Dreher et al., 1993, Morley et Vickery, 1997, Tusa et Palmer, 1980, Wang et Dreher, 1996).

1.5 Le LP-pulvinar

Les communications entre les aires corticales peuvent également se faire en passant par des noyaux thalamiques de 2^e ordre tel que le complexe Latéral Postérieur du pulvinar (LP-pulvinar, (Casanova, 2004)). Contrairement au CGL, ce noyau du thalamus reçoit ses entrées visuelles principalement du cortex et très peu de la rétine, il est d'ailleurs connecté avec la majorité des aires corticales. Cette structure est séparée en 3 sous-structures chez le chat : une partie latérale (LPI), médiale (LPm), et le noyau « Pulvinar » (Graybiel et Berson, 1980, Updyke, 1977, 1981, 1983). La figure 6 montre que le LPI établit des connexions réciproques avec le cortex visuel primaire (e.g. aires 17 et 18) et les structures du sulcus suprasylvien participant à la voie dorsale et ventrale (e.g. PMLS et aire

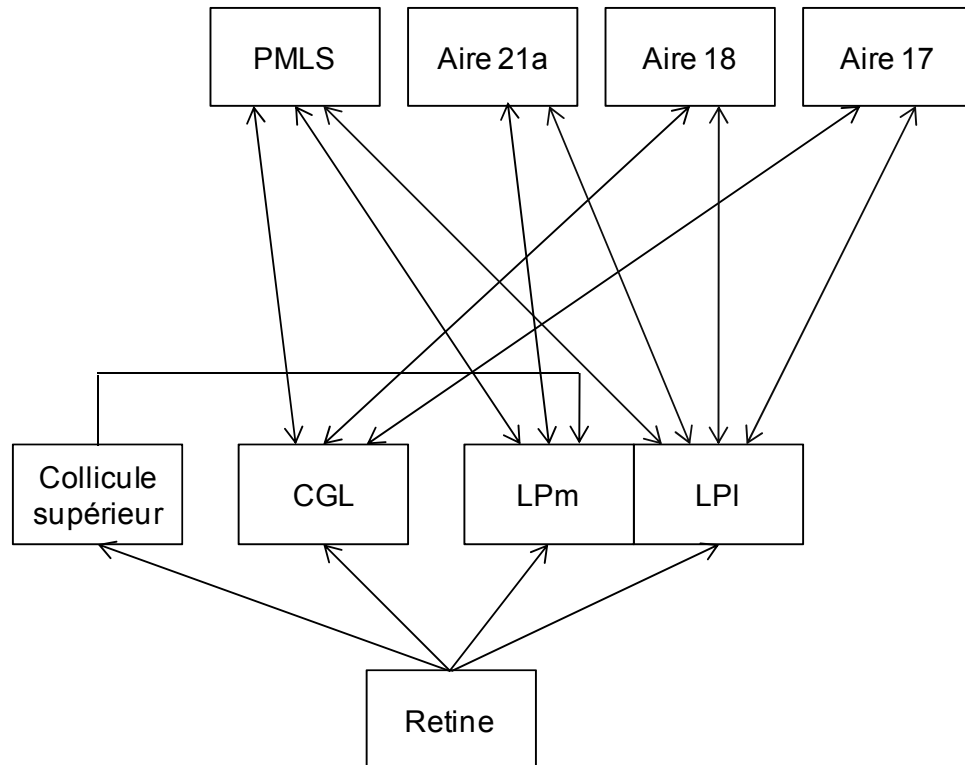


Figure 6. Complexe Latéral-Postérieur (LP)

Connexions cortico-thalamiques entre certaines aires visuelles, le LPI et le LPm.
Adaptée de Casanova (2004).

21a). Le LPm, quant à lui, établit des connexions réciproques uniquement avec les structures corticales de plus haut niveau (cortex suprasylvien et ectosylvien) et aucune avec le cortex visuel primaire (Abramson et Chalupa, 1985, Graybiel et Berson, 1980).

Les neurones du LP-pulvinar sont très sélectifs aux mouvements et ont de larges champs récepteurs (Casanova et al., 1989, Casanova et Savard, 1996a, b, Chalupa et Abramson, 1989, Dumbrava et al., 2001, Merabet et al., 1998). Le premier rôle qui pourrait être attribué au noyau LP-pulvinar pourrait être une simple fonction de relais cortico-thalamo-cortical. Toutefois, le nombre important et la grande diversité des aires corticales avec qui il a des connexions réciproques font du LP-pulvinar un excellent candidat pour représenter un rôle de centralisateur des informations visuelles : Cette structure permettrait par exemple de relier entre elles les informations de plusieurs analyses liées à l'*identification* ou à la *localisation* et permettre ainsi un percept cohérent.

2 Cartes corticales

2.1 Cartes dans le cortex visuel

Les neurones dans les aires corticales peuvent s'organiser en fonction de leurs propriétés de manière aléatoire ou se regrouper en fonction de leur propriété (e.g. Sélectivité à l'orientation ou à la fréquence spatiale). Le regroupement des neurones est une stratégie qui permettrait d'optimiser l'analyse (voir section 7.4 de la discussion). L'organisation en domaine fonctionnel est la plus souvent rencontrée et implique la notion de colonne corticale (i.e. la propriété est conservée dans toutes les couches du cortex). Au sein d'une aire corticale, ces domaines peuvent être uniques (e.g. carte continue de rétinotopie) ou périodiques (e.g. carte en domaines d'orientation).

2.1.1 Rétinotopie

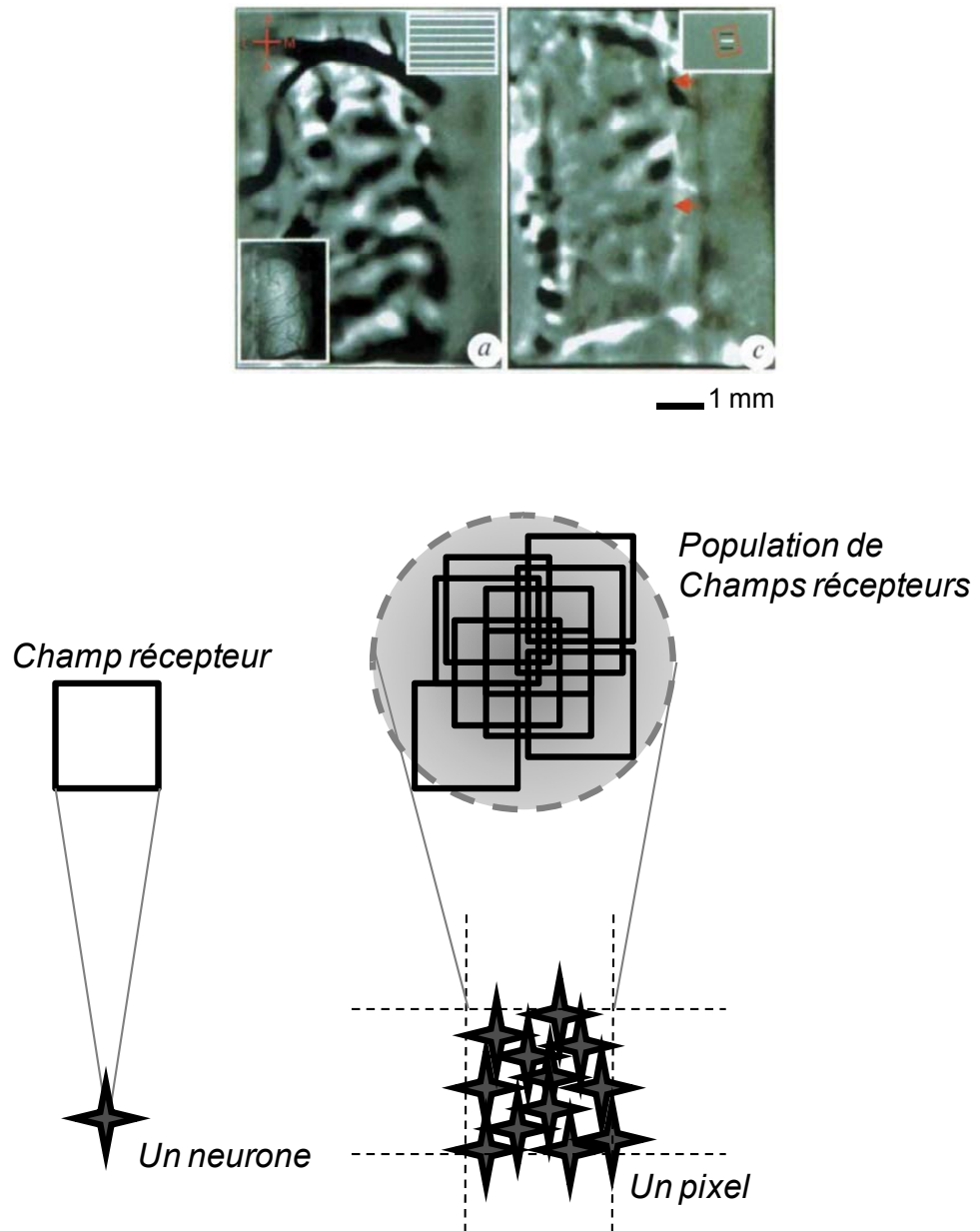
La carte de rétinotopie correspond à la représentation bidimensionnelle du champ visuel dans une structure cérébrale et est présente chez tous les mammifères (Kaas 1997). Ces cartes sont également toujours visibles dans les structures de bas niveau (e.g. cortex visuel primaire, CGL et collicule supérieur) et, en conjonction avec l'élargissement de la taille des champs récepteurs, peuvent être plus diffuses dans les structures de plus haut niveau au profit de paramètres plus complexes.

Des études réalisées par électrophysiologie chez le chat ont permis de révéler l'organisation de la rétinitopie dans différentes aires corticales (Palmer et al., 1978, Tusa et Palmer, 1980, Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979, Albus et Beckmann, 1980). La figure 5 montre que dans les aires 17 et 18, l'élévation est majoritairement représentée dans l'axe antéropostérieur (avec la partie basse du champ visuel dans la partie antérieure du cortex et réciproquement pour la partie haute du champ visuel). La représentation de l'azimut est représentée majoritairement dans l'axe médio-latéral du cortex à la façon d'une "carte routière dépliée" : Les frontières entre les aires 17 et 18 correspondant au méridien vertical et l'hémi-champ controlatéral est représenté en miroir dans ces deux aires. Il est à noter que chez le chat, chaque hémisphère analyse les informations du champ visuel contra-latéral majoritairement; cette séparation est présente depuis les entrées des cellules ganglionnaires de chaque hémi-rétine dans le CGL.

L'augmentation de la densité des cellules ganglionnaires de la rétine dans la partie centrale du champ visuel est en partie à l'origine d'une surreprésentation de cette portion du champ visuel dans le cortex. Ce facteur d'agrandissement cortical ("cortical magnification factor") est à l'origine d'une distorsion des cartes de rétinitopie dans les aires 17 et 18. De plus, le positionnement des champs récepteurs de chaque neurone adjacent ne suit pas non plus une reproduction exacte du champ visuel tel que cela pourrait l'être avec le capteur CCD d'une caméra. En effet, la figure 7 montre que la position de chaque champ récepteur varie plus ou moins et cette dispersion participe au phénomène de "point spread" observé en imagerie optique ((Das et Gilbert, 1995), i.e. un point dans le champ visuel correspond à une surface d'activation corticale non ponctuelle dans le cortex).

2.1.2 Orientation.

Dans le cortex visuel primaire des primates, des carnivores et des toupayes, les neurones se regroupent en domaines d'orientation (parmi elles : Grinvald et al., 1986, Blasdel et al., 1992a,b, Bosking et al., 1997, Rao et al., 1997, ...). La figure 8 montre que ces domaines s'organisent de manière périodique autour de points de convergence appelés "pinwheels" (Bonhoeffer et Grinvald, 1991, Ohki et al., 2006). Aucune évidence de l'existence de telles cartes n'a par contre été démontré chez les rongeurs (Van Hooser, 2007, Van Hooser et al., 2005). Par contre ce type



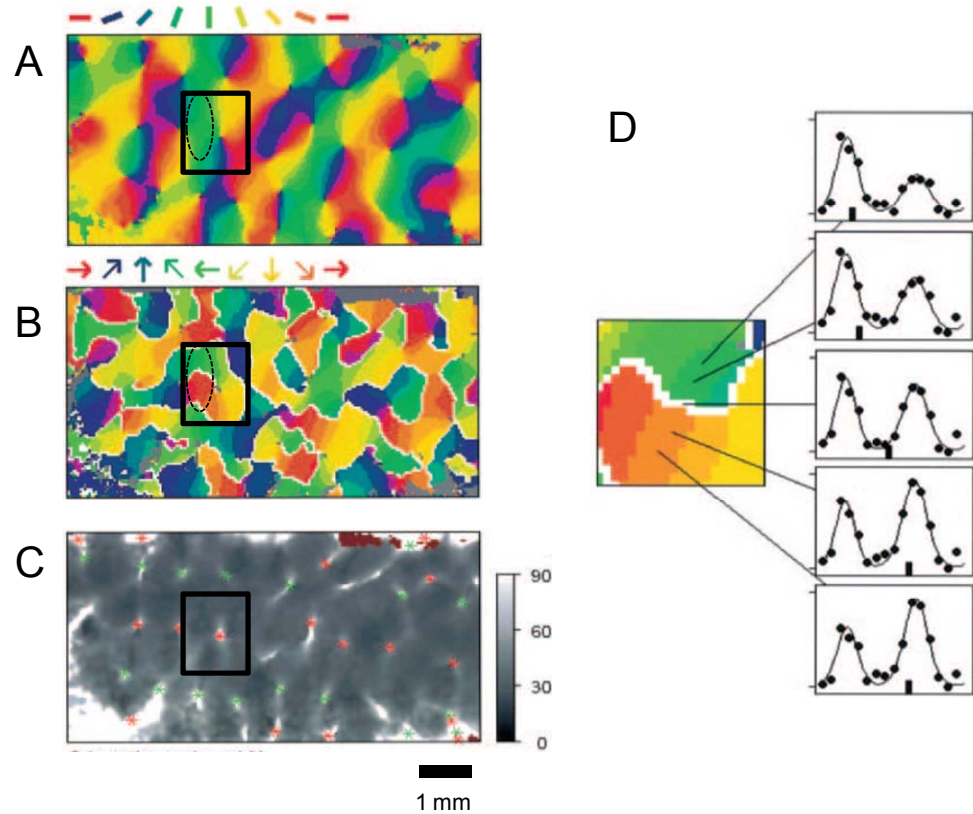


Figure 8. Cartes d'orientation et de direction

Cartes d'orientation (A), de direction (B) et de largeur de bande de la réponse à l'orientation (C) dans le cortex visuel primaire du chat révélées par imagerie optique. Le carré indique la position d'un « pinwheel ». L'ovale pointillé indique la position d'un domaine d'orientation verticale (vert) associé à des domaines de directions opposées (vers la gauche, vert, et vers la droite, rouge). (D) Réponse à la direction de part et d'autre de deux modules de direction opposées. La ligne blanche indique la zone de fracture où la sélectivité à la direction est faible. Sur les courbes de réponse, la ligne noire continue indique la modélisation des réponses par la somme de deux courbes de Von Mises. Adaptée de Swindale et al. (2003).

d'organisation a été révélé dans des structures extra striées chez le chat (aire 21a : (Huang et al., 2006), étude réalisée en parallèle de l'étude 2 de cette thèse) et les primates (V2 : (Xu et al., 2004a, Xu et al., 2005, Vanduffel et al., 2002), V4 : (Ghose et Ts'o, 1997) et MT : (Xu et al., 2004b, Maloney et al., 1994, Diogo et al., 2003, Xu et al., 2006)) et a même été rapporté dans l'équivalent du télencéphale chez certains oiseaux tels que les rapaces (Liu et Pettigrew, 2003).

Il est à noter que dans de nombreuses aires corticales de plusieurs espèces, la surface des domaines pour chaque orientation peut être distribuée de façon hétérogène avec une surreprésentation des orientations cardinales (Dragoi et al., 2001, Xu et al., 2007, Huang et al., 2006, Coppola et al., 1998, Xu et al., 2006, Chapman et Bonhoeffer, 1998). Quant à la périodicité des modules, elle est variable en fonction des aires corticales et des espèces. Il a parfois été proposé qu'il existe une certaine relation entre la période des modules et la taille des champs récepteurs des neurones sous-jacents. Par exemple, dans l'aire 17 du chat, la période des modules est plus petite que dans l'aire 18 où les champs récepteurs sont plus grands (Rao et al., 1997, Bonhoeffer et Grinvald, 1993, Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979). Une autre évidence apportée par (Xu et al., 2007) a montré que dans l'aire V1 du primate, la densité des "pinwheels" (inversement reliée à la période des modules) diminuait en fonction de l'excentricité (reliée à la taille des champs récepteurs). Toutefois, cette règle semble contradictoire avec les résultats apportés par (Huang et al., 2006) qui ont montré une densité de "pinwheels" plus importante dans l'aire 21a que dans l'aire 17 alors que les champs récepteurs des neurones y sont plus larges. D'autres facteurs semblent donc intervenir dans la détermination de la périodicité des cartes d'orientation.

2.1.3 Direction

En mesurant la sélectivité d'une multitude de paires de neurones dans le cortex visuel du chat, (DeAngelis et al., 1999) ont pu évaluer le taux de regroupement de plusieurs paramètres et ont montré que la direction avait également une tendance à s'organiser en colonne, mais de façon moins prononcée que dans le cas de l'orientation (figure 9). La figure 8 montre l'organisation modulaire pour la direction en conjonction de celle pour l'orientation : chaque module d'orientation est subdivisé en sous-modules de directions opposées l'une de l'autre et orthogonales à l'axe de l'orientation (Kim et al., 1999, Kisvarday et al., 2001,

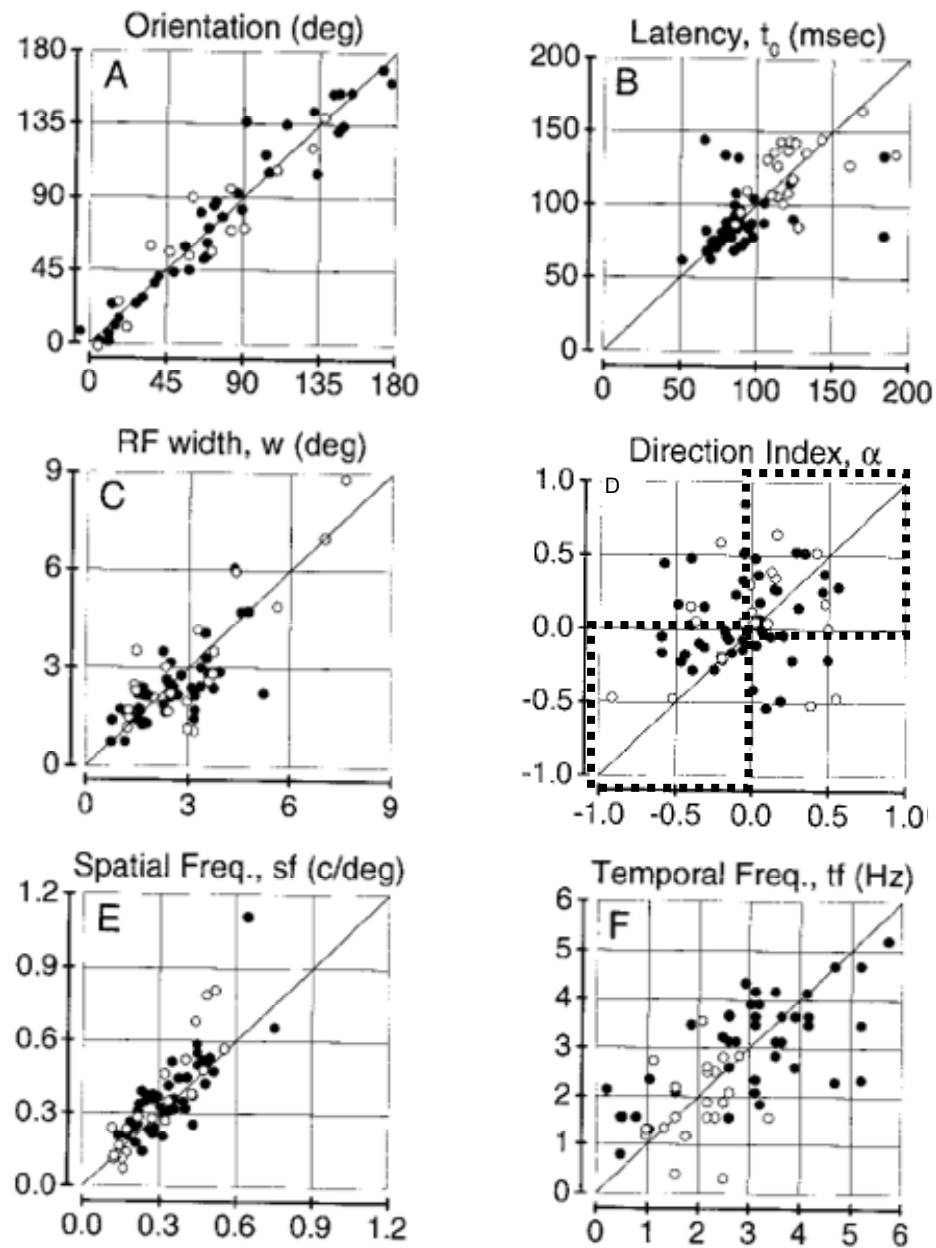


Figure 9. Regroupement spatial des paramètres

Corrélations entre paires de neurones voisins pour plusieurs paramètres : orientations préférées (A), latence des réponses (B), largeur de bande (C), sélectivité à la direction (D), fréquence spatiale (E) et temporelle (F). En D, 62% des paires se trouvaient dans les carrés délimités par les lignes pointillées (signifiant une même direction préférée). Adaptée de DeAngelis et al., (1999).

Shmuel et Grinvald, 1996, Swindale et al., 2003, Swindale et al., 1987). Les transitions entre deux modules de direction opposées se font brutalement dans des zones appelées "fractures" où la sélectivité pour le mouvement est très faible (Kim et al., 1999, Ohki et al., 2005, Swindale et al., 2003, Weliky et al., 1996). Une organisation similaire a également été mise en évidence dans l'aire MT des primates (Albright et al., 1984, Malonek et al., 1994, Diogo et al., 2003, Xu et al., 2004b). Elle n'a par contre jamais été révélée dans aucune autre aire extra striée chez le chat ou dans le cortex visuel des rongeurs et ce, même à un niveau microscopique (Ohki et al., 2005). Un des objectifs de l'étude 2 de cette thèse va donc être de caractériser la présence de cartes de direction dans l'aire 21a du chat. Comme c'était le cas pour l'orientation, la surface des domaines pour chaque direction semble distribuée de façon hétérogène dans l'aire 18 du chat (Berman et al., 1987, Ribot et al., 2008). Il semble en effet que la surface dédiée aux directions naso-temporales soient favorisées par rapport aux directions temporo-nasales. Cela pourrait suggérer une optimisation de l'information transmise vers les aires de plus haut niveau réalisant l'analyse du flux optique (e.g. aires du sulcus suprasylvien latéral (Brosseau-Lachaine et al., 2001)).

2.1.4 Fréquence spatiale

Bien que (DeAngelis et al., 1999) aient démontré un certain taux de regroupement pour la fréquence spatiale dans le cortex visuel primaire du chat, l'étude de son organisation corticale reste plus difficile en comparaison à celle de l'orientation. A l'origine, plusieurs modèles d'organisation ont tout d'abord été proposés : laminaires (Maffei et Fiorentini, 1977), en "cluster" (Tolhurst et Thompson, 1982, Molotchnikoff et al. 2007) ou en colonnes corticales (Tootell et al., 1981). Par la suite l'imagerie optique a permis de favoriser l'hypothèse d'une organisation en colonnes en mettant en évidence des domaines exclusivement de haute ou de basse fréquence spatiale (Hubener et al., 1997, Shoham et al., 1997, Bonhoeffer et al., 1995) et plus récemment en domaines continus (Everson et al., 1998, Issa et al., 2000).

Ces observations sont malgré tout en contradiction avec les observations de (Movshon et al., 1978) qui ont montré une grande diversité de sélectivité à la fréquence spatiale dans chaque site d'enregistrement étudié. De plus, (Sirovich et Uglesich, 2004) ont par la suite ré-analysé les données de l'étude de (Issa et al.,

2000) et ont prétendu que leurs résultats étaient entre autre attribuables à des artefacts dus aux vaisseaux sanguins inhérents à la méthode d'imagerie des signaux intrinsèques. Cette polémique a en partie été résolue avec l'utilisation de l'imagerie optique de l'auto-fluorescence des flavoprotéines qui mesure l'activité métabolique des neurones indépendamment des composantes vasculaires (voir chapitre 6.2.2 de la discussion). En employant cette technique, (Mallik et al., 2008) ont obtenu des cartes de fréquence spatiale similaires entre les signaux intrinsèques et l'auto-fluorescence (figure 10) soutenant ainsi les résultats obtenus par (Issa et al., 2000).

En conclusion, chez le chat il semble donc que la fréquence spatiale soit organisée en domaine dans l'aire 17 et qu'une transition de la moyenne des fréquences spatiales soit observable entre l'aire 17 et l'aire 18 (Bonhoeffer et al., 1995, Issa et al., 2000, Ohki et al., 2000, Zhan et Baker, 2008). Le même type d'organisation modulaire a également pu être observé dans le cortex visuel primaire d'un autre carnivore (i.e. le furet, (Farley et al., 2007, Yu et al., 2005)) et du primate (Purushothaman et al., 2009, Xu et al., 2007).

2.1.5 Dominance oculaire

Les projections des cellules du CGL respectent une certaine ségrégation dans le cortex à l'égard de quel œil les informations proviennent. Cette organisation est à l'origine des cartes de dominance oculaire qui sont évidentes dans le cortex visuel primaire de la plupart des primates (Blasdel, 1992a, b, Blasdel et Salama, 1986, Ts'o et al., 1990, Frostig et al., 1990, LeVay et al., 1975).

Dans le cortex visuel primaire du chat, cette organisation a tout d'abord été mise en évidence anatomiquement et électrophysiologiquement (Cynader et al., 1987, LeVay et al., 1978, Shatz et Stryker, 1978) et reste plus diffuse que chez les primates dans les études en imagerie optique (Bonhoeffer et al., 1995, Kim et al., 1999). Une des explications serait que la plupart des neurones des couches superficielles chez le chat sont binoculaires et que les cellules monoculaires, situées dans la couche IV sont peu accessibles par l'imagerie optique (voir section 6.2.3 de la discussion). Cette organisation en colonne semble par contre absente dans la zone binoculaire du cortex visuel primaire des rongeurs et des lagomorphes (souris : (Drager, 1974) ou lapin : (Hollander et Halbig, 1980)) et des toupayes (Humphrey et al., 1977).

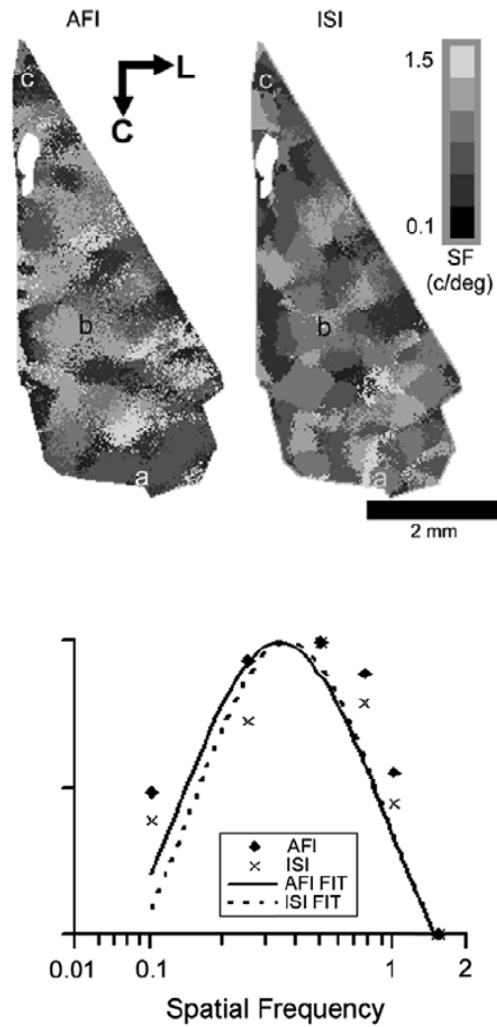


Figure 10. Carte de fréquence spatiale

(en haut) Comparaison des cartes de fréquence spatiale de l'aire 17 du chat mesurées par autofluorescence (AFI, à gauche) ou en absorbance (ISI, à droite). (en bas) Comparaison du profil de réponse pour la fréquence spatiale mesuré dans un pixel à partir du signal de l'autofluorescence (ligne continue) ou de l'absorbance (ligne pointillée). Adaptée de Mallik et al., (2008).

2.1.6 Interactions centre / pourtour

En étudiant le marquage au 2-dexoxy-glucose (2-DG) en réponse à des stimulations en mouvement présentées plein écran (Born, 2000, Born et Tootell, 1992) ont révélé la présence de modules de forte et faible intensité d'activité dans l'aire MT du primate (figure 11). Ces cartes ont alors été mises en correspondance avec les propriétés des cellules préalablement enregistrées par microélectrode. Dans les modules de faible marquage, les cellules montraient majoritairement une suppression par le pourtour ce qui suggère qu'il existerait une organisation en domaine de forte et faible suppression par le pourtour dans cette aire de haut niveau. Ce type d'organisation n'a encore jamais été révélé au niveau du cortex visuel primaire. L'objectif de l'étude 1 de cette thèse va donc être d'étudier la présence de ce type d'organisation dans les aires 17 et 18 du chat.

2.2 Interactions spatiales entre les cartes

De nombreux paramètres peuvent être ainsi représentés en colonnes dans le cortex, seules les plus importants ou ceux ayant un intérêt particulier pour les études de cette thèse ont été exposés. Étant donné que le cortex est une structure en 2 dimensions, les "N" cartes de paramètre (i.e. N dimensions) doivent subir des contraintes pour pouvoir s'agencer uniformément les unes par rapport aux autres (Durbin et Mitchison, 1990).

L'organisation généralement rencontrée est que les 2 dimensions du champ visuel (i.e. rétinotopie) sont retranscrites dans les 2 dimensions du cortex. Puis, les autres paramètres (orientation, dominance oculaire, fréquence spatiale, ...) s'organisent en domaines périodiques et de manière à ce qu'en chaque point du cortex – et donc virtuellement en chaque point du champ visuel – toutes les possibilités de paramètres puissent être représentées uniformément. Ce principe "d'uniformité de recouvrement" (Swindale, 2001, Swindale, 1998a, 2000, Swindale et al., 2000) est, dans le principe, similaire à la notion d'hyper-colonne introduite par D. Hubel il y a quelques dizaines d'années (Hubel et Wiesel, 1962, 1977) : le cortex est organisé en modules correspondant à chaque portion de l'espace visuel et où toutes les possibilités d'orientations et de dominance oculaire sont représentées. La période des modules est généralement de l'ordre du millimètre et correspond à un compromis entre l'uniformité de recouvrement et la nécessité du regroupe-

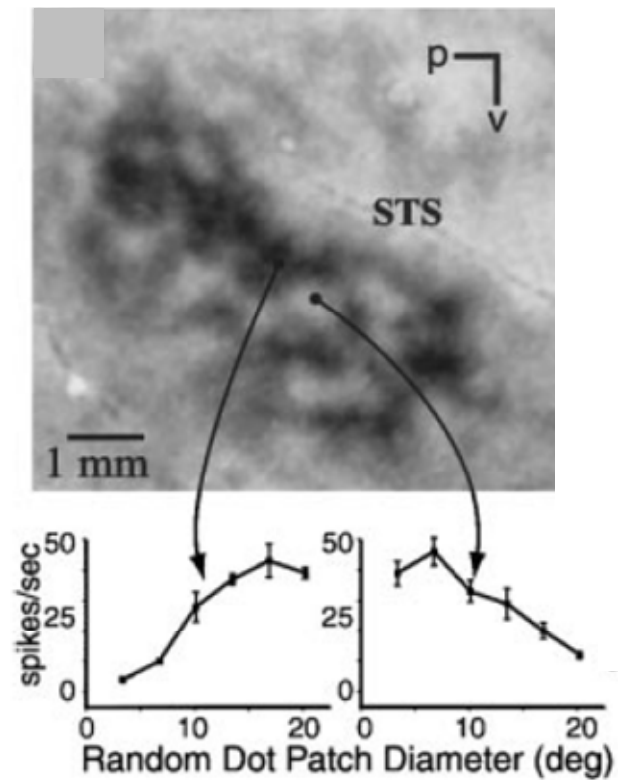


Figure 11. Carte de suppression par le pourtour

Marquage au 2-DG dans l'aire MT en réponse à une stimulation plein écran. Les réponses de deux neurones en fonction de la taille du stimulus sont présentées et montre que dans les domaines de faible marquage, la suppression par le pourtour est forte. Adaptée de Born (2000).

ment fonctionnel qui représente un gain d'efficacité dans le traitement de l'information (voir section 7.4 de la discussion).

D'un point de vue morphologique, les frontières entre les modules tendent à être orthogonales entre chaque paramètre. Toutefois, lorsque le nombre de paramètres devient important, les contraintes spatiales sont plus fortes et on assiste généralement à une diminution de cette règle d'orthogonalité et à une complexification des frontières entre modules (qui se manifeste par une augmentation du gradient, (Swindale, 2004, Carreira-Perpinan et al., 2005)).

Voici certaines interactions entre les cartes qui ont pu être mise en évidence expérimentalement:

Orientation vs. dominance oculaire. Le type d'interaction spatiale préalablement décrit est évident entre les cartes d'orientation et de dominance oculaire. Sur la figure 12, il est en effet possible de constater que les « pinwheels » de la carte d'orientation se retrouvent généralement au centre des colonnes de dominance oculaire. Il est également possible de constater que les isobares d'orientation sont généralement à angle droit avec les frontières des colonnes de domaines oculaires (Hubener et al., 1997, Issa et al., 2000, Kim et al., 1999, Yu et al., 2005, White et al., 2001, Obermayer et Blasdel, 1993).

Orientation vs. fréquence spatiale. Une interaction spatiale semble également exister entre les cartes de fréquence spatiale et d'orientation. Tout comme pour la dominance oculaire, le centre des domaines de haute et basse fréquence spatiale semblerait se co-localiser avec les « pinwheel » de la carte d'orientation (Hubener et al., 1997, Issa et al., 2000, Xu et al., 2007).

Orientation vs. direction. La relation entre la carte de direction et l'orientation est un cas particulier, dans la mesure où ces deux propriétés sont orthogonales entre elles et que chaque module d'orientation se subdivise en sous-modules de directions opposées (figure 8). En conséquence il n'existe pas d'uniformité de recouvrement dans ce cas puisque chaque domaine d'orientation n'est associé en

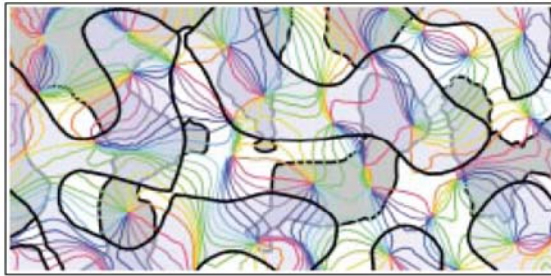


Figure 12. Uniformité de recouvrement

Superposition de la carte d'orientation (lignes colorées), de dominance oculaire (lignes noires) et de fréquence spatiale (haute et basse fréquences spatiales, domaines blancs et gris) dans une zone du cortex. Adaptée de Swindale (1998) et Hubener et al. (1997).

théorie qu'à deux types de modules de directions et non pas à une infinité (Shmuel et Grinvald, 1996, Swindale et al., 2003).

3 Imagerie optique des signaux intrinsèques

L'organisation périodique des différents paramètres présentés précédemment se trouve généralement dans une gamme de période de l'ordre du millimètre et ce, dans des structures corticales de l'ordre du centimètre (chez les carnivores et les primates). Leur étude fonctionnelle nécessite donc l'emploi de méthodes d'investigation neurophysiologique optimales pour ces échelles de grandeur que jusqu'ici, seule l'imagerie optique des signaux intrinsèques permet d'apporter (i.e. résolution de l'ordre d'une centaine de micromètres, sur des portions de cortex de l'ordre du cm^2). Ce chapitre va donc se concentrer sur la description de cette technique et de son emploi car c'est cette approche qui a été retenue dans toutes les études réalisées dans cette thèse.

3.1 De l'imagerie fonctionnelle à l'imagerie optique intrinsèque

Les méthodes d'imagerie fonctionnelle permettent d'étudier l'organisation spatiale des réponses neuronales. Parmi celles-ci, les méthodes d'imagerie optique des signaux intrinsèques possèdent plusieurs avantages : leur mise en place est souvent peu coûteuse (Hillman, 2007), elles n'utilisent pas de substances potentiellement nocives (telle que des radio-isotopes ou des marqueurs extrinsèques) et la durée des enregistrements peut se faire sur de très longues durées (i.e. 5 à 6 jours dans le cas des quatre études présentées dans cette thèse). Ces méthodes se basent sur la mesure des changements d'absorption (provoqués principalement par l'hémoglobine), de fluorescence et de diffusion de la lumière. Ces principes sont aujourd'hui largement utilisés aussi bien dans des études cliniques que fondamentales. Toutefois, ces techniques sont invasives lorsque l'os recouvrant le cerveau est retiré chez l'animal dans le but d'augmenter considérablement la résolution spatiale ou plus exceptionnellement, lorsque en raison d'une intervention neurochirurgicale, le cortex est accessible directement chez l'humain (Pouratian et al., 2003). De plus, l'exploitation de ces phénomènes d'absorptions et de diffusions de la lumière est à « double tranchant » dans la mesure où ces mêmes phénomènes vont limiter la pénétration de la lumière dans le cerveau (i.e. le plus souvent aux couches supérieures du cortex). Dans la suite

de ce chapitre, l'emphase sera mise uniquement sur l'imagerie optique des signaux intrinsèques provenant du sang en configuration « crâne ouvert » sur l'animal anesthésié (utilisée dans les quatre études de cette thèse).

3.2 La mise en évidence d'un couplage neurovasculaire

Les premières observations d'un couplage entre l'activité cérébrale et vasculaire furent effectuées par Angelo Mosso au XIXe siècle (voir pour revue : (Zago et al., 2009)). En mesurant la pression intracrânienne au travers de brèches dans le crâne de patients ayant subi des interventions neurochirurgicales, il constata que l'amplitude des pulsations du cerveau était augmentée lors de tâches émotionnelles ou cognitives (e.g. calcul mental, figure 13). Par la suite, (Roy et Sherrington, 1890) constatèrent également des modifications de la pression intracrânienne sur des animaux suites à des stimulations électriques périphériques. Plus tard, (Sokoloff et al., 1977) constatèrent qu'en parallèle de ces événements vasculaires, une augmentation de la consommation en glucose (mesurée par accumulation de 2-Deoxy-Glucose) était également observée dans le cerveau lors d'une augmentation de son activité.

Les changements d'activité neuronale provoquent donc des réponses hémodynamiques et métaboliques. Plusieurs techniques exploitent ces phénomènes de couplage neuro-hémodynamique dont l'imagerie optique des signaux intrinsèques (Frostig et al., 1990, Grinvald et al., 1986), la tomographie par émission de positron utilisant l' H_2O^{15} (Fox et Raichle, 1986, 1984, Mintun et al., 1989) ou l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf, Ogawa et al., 1992, Ogawa et al., 1990). Malgré tout, les mécanismes complexes de ce couplage ne sont pas encore complètement élucidés et ont subi un regain d'intérêt depuis ces 20 dernières années (Vanzetta et Grinvald, 2008).

3.3 Les mécanismes du couplage

L'hémoglobine est la principale molécule absorbante du sang dans le visible et l'infrarouge. Cette propriété est exploitée par les techniques d'imagerie optique fonctionnelle mesurant les changements liés au flux sanguin, au volume sanguin et à l'oxygénation de l'hémoglobine. Comme on peut le constater sur le spectre présenté en figure 14, le profil d'absorption de l'hémoglobine n'est pas le même selon le niveau d'oxygénation. Toutefois, aux longueurs d'onde isobétiques (e.g.

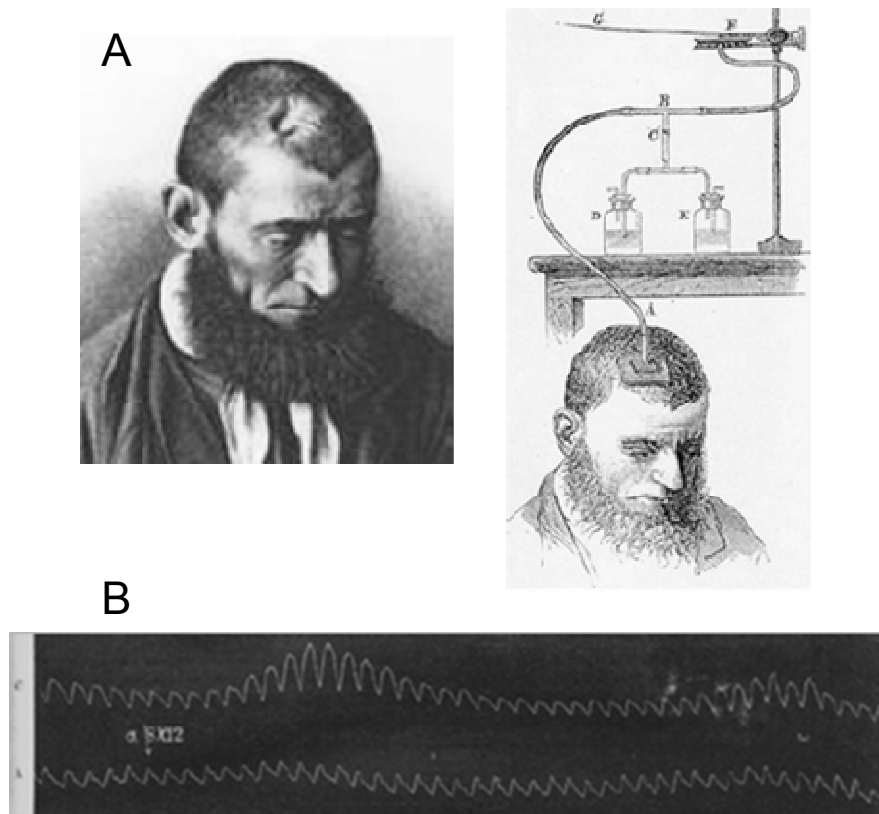


Figure 13. Mesure des variations du volume sanguin

(A) Dispositif de mesure des pulsations de volume sanguin cérébral développé par A. Mosso. (B) La trace du haut représente les pulsations en réponse à un calcul mental, la trace du bas est un enregistrement de référence (pulsations provenant du bras). Adaptée de Zago et al., (2009).

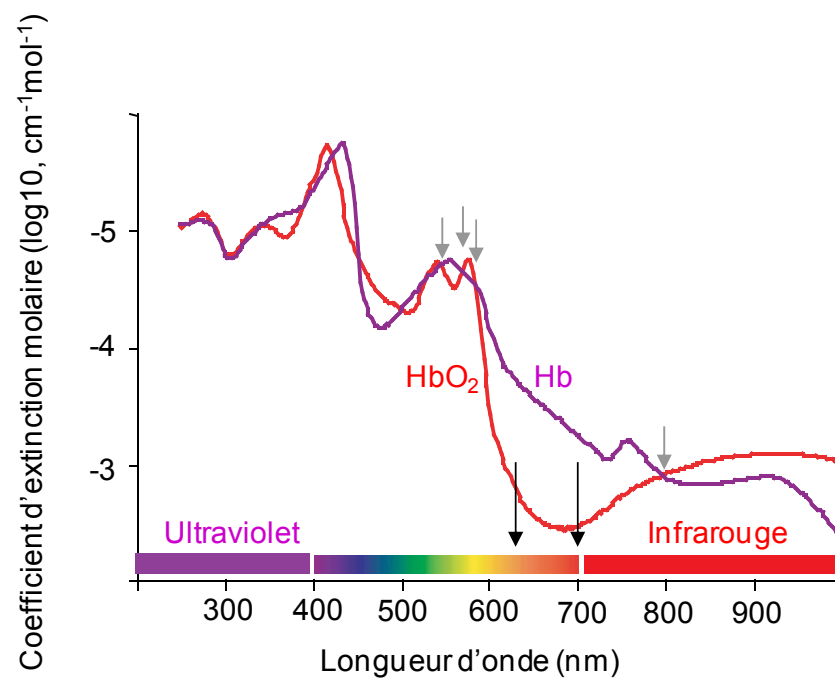


Figure 14. Spectre d'absorption de l'hémoglobine

Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂) et réduite (Hb). Les flèches noires indiquent les positions des deux longueurs d'ondes qui ont été utilisées dans les études de cette thèse. Certaines longueurs d'onde isobétiques sont indiquées par les flèches grises.

570 ou 800 nm), son absorption est identique pour ces deux états d'oxydation. Des enregistrements effectués à ces longueurs d'onde ne sont donc pas sensibles aux variations d'oxygénation de l'hémoglobine mais à la quantité totale d'hémoglobine et donc aux variations du volume sanguin.

Si les mesures sont effectuées de part et d'autres de ces points isobétiques (e.g. dans la gamme de couleur orange-rouge du spectre), le signal obtenu est en plus affecté par l'oxygénation du sang (Frostig et al., 1990, Vanzetta et al., 2005). Comme on peut le voir sur le spectre de la figure 14, l'absorption de l'hémoglobine réduite (Hb) est plus forte que celle de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂). Vers 610nm, le signal enregistré est considéré comme principalement relié aux variations de Hb (Vanzetta et Grinvald, 2008). Toutefois, afin d'évaluer quantitativement les concentrations d'HbO₂ et d'Hb, des mesures doivent être effectuées à différentes longueurs d'ondes (Dunn et al., 2005) ou en diffractant la lumière pour obtenir les variations du spectre d'absorbance (Shtoyerman et al., 2000, Malonek et Grinvald, 1996). Ensuite, en se basant sur la loi de Beer Lambert modifiée et en prenant en compte (1) les spectres d'absorption d'HbO₂ et Hb, (2) la diffusion de la lumière et (3) les variations d'absorbance enregistrées pour chaque longueur d'onde, il est possible d'évaluer les changements de concentration de HbO₂ et Hb à l'aide d'un modèle linéaire (Figure 15, voir pour revue : (Hillman, 2007)).

A la suite d'une stimulation cérébrale, il est ainsi possible d'observer une diminution de la concentration en Hb en parallèle d'une augmentation de la concentration en HbO₂, du volume sanguin et du flux sanguin (Dunn et al., 2005, Hillman et al., 2007). L'étendue de ces variations est en général beaucoup plus large que l'étendue des activations neuronales.

Dans certains cas, une petite augmentation transitoire peut précéder la diminution de Hb (« initial dip », (Malonek et Grinvald, 1996, Vanzetta et al., 2005)). Contrairement aux événements décrits précédemment, cet événement transitoire semble très localisé avec l'activation neuronale. Les mécanismes précis et la raison pour laquelle cet événement n'est pas présent dans toutes les études restent complexes. Quoi qu'il en soit, il semble que cette augmentation transitoire d'Hb soit due à la consommation locale d'O₂ par les neurones avant la réponse hémodynamique en tant que tel. C'est son couplage direct avec l'activité neuronale qui expliquerait sa grande spécificité.

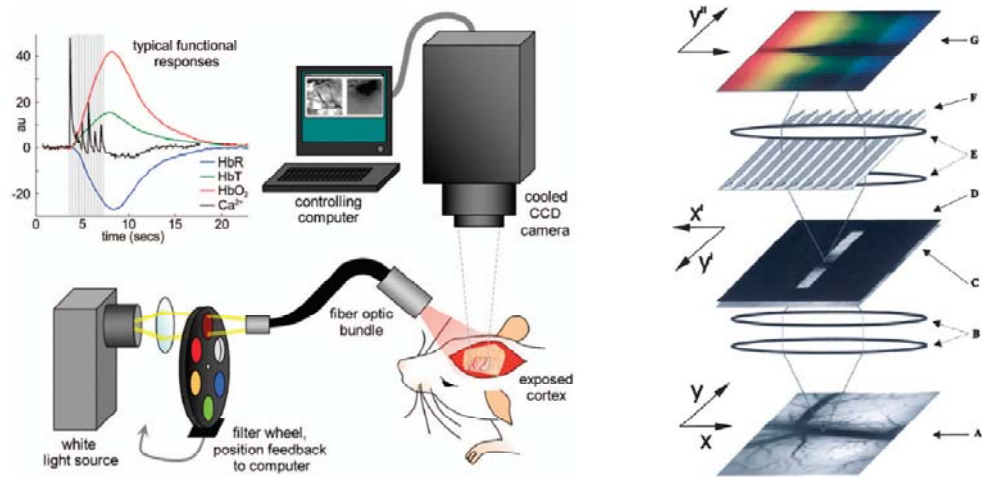


Figure 15. Spectrométrie et mesure de l'oxygénation de l'hémoglobine

Dispositif d'évaluation de la concentration en HbO_2 et Hb. (à gauche) le cerveau est illuminé alternativement à différentes longueurs d'onde. Un système linéaire permet ensuite de calculer les variations d' HbO_2 (ligne rouge), d'Hb (ligne bleue) et du volume sanguin (courbe verte). (à droite) l'absorbance à chaque longueur d'onde peut également être mesurée en diffractant la lumière blanche illuminant le cerveau. Adaptée de Hillman (2007) et Shtoyerman et al., (2000).

Les différentes composantes neuro-hémodynamiques décrites ci-dessus agissent donc comme des filtres spatiotemporels sur les cartes d'activité neuronale (Vanzetta et Grinvald, 2008). Certains filtres semblent passifs tels que celui lié à Hb lors de « l'initial dip » car localisé au niveau des capillaires. Les autres sont plus complexes et peuvent faire intervenir différents types de vaisseaux sanguins. Comme cela a été mentionné précédemment, il est possible d'observer des changements d'absorption reliés à l'activation neuronale en utilisant qu'une seule longueur d'onde. C'est cette stratégie qui a été retenue pour les quatre études de cette thèse car elle est simple à mettre en œuvre et maximise la sensibilité. La figure 16 décrit le montage de base utilisé dans de nombreuses études pour réaliser des cartes corticales de changements relatifs. Pour maximiser la spécificité du signal il était important de choisir des longueurs d'ondes favorisant la contribution des changements de Hb plus reliée à l'activation neuronale (i.e. dans la partie orange-rouge du spectre). Les longueurs d'onde utilisées dans les travaux présentés dans cette thèse étaient 630nm (études 1, 3a et 3b) et 700nm (étude 2).

3.4 Carte d'activation

3.4.1 Le bruit domine le signal

Le dispositif de base lors de tous les enregistrements qui seront présentés ici a fait appel à une caméra CCD enregistrant la réflexion d'une lumière rouge sur le cortex. En chaque point du cortex, la réflexion de la lumière était alors modifiée par les changements d'absorption suite à des stimulations visuelles. Toutefois, le signal évoqué par les stimulations représente au maximum 0.1% du signal enregistré (voir pour revue : (Bonhoeffer et Grinvald, 1996, Zepeda et al., 2004)). Il est donc invisible à l'œil nu et différentes stratégies ont été développées pour pouvoir le discriminer du bruit et obtenir des cartes d'activation quantifiables (« single condition maps »). C'est avec les *cartes d'activation* pour différents stimuli qu'il est ensuite possible de réaliser des *cartes de sélectivité* (e.g. direction préférée) ou de calculer des indicateurs quantitatifs (e.g. index de sélectivité à la direction) comme cela sera présenté dans le chapitre 3.5.

Les différentes sources de bruit sont principalement d'origine physiologique : il s'agit de fluctuations du sang provoquées par les pulsations cardiaques et respiratoires ainsi que des ondes de basse fréquence (~0.1 Hz chez l'homme et le chat) appelées ondes de Mayer (Julien, 2006, Mayhew et al., 1996, Obrig et al.,

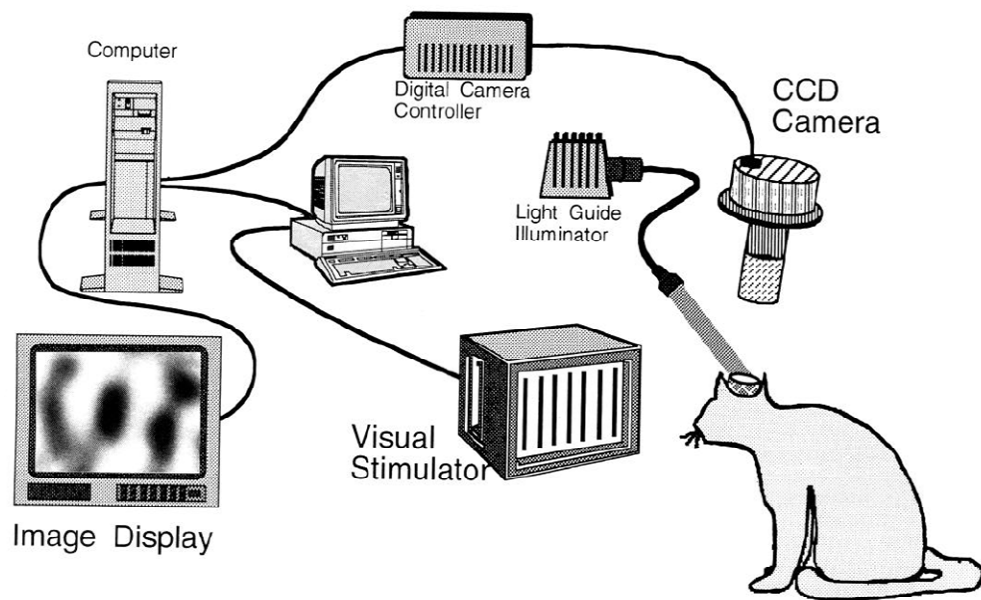


Figure 16. Dispositif d'enregistrement

Dispositif d'enregistrement utilisé dans toutes les études de cette thèse. Le cortex visuel est illuminé à une longueur d'onde unique et enregistré à l'aide d'une caméra CCD suite à des activations visuelles. Adaptée de Bonhoeffer et al. (1993).

2000, Tachtsidis et al., 2004). Cette dernière source de bruit vasculaire, non spécifique au cerveau, n'est pas encore bien comprise mais semble consister en des cycles de contraction/dilatation des vaisseaux.

Les cartes d'activation sont donc majoritairement contaminées par du bruit bidimensionnel de basse fréquence spatiale (provenant en grande partie des ondes de Mayer) mais également des fluctuations d'amplitude importantes au niveau des vaisseaux sanguins présents à la surface du cortex. Différentes stratégies ont donc été développées pour réduire ces contributions et vont faire l'objet du chapitre suivant.

3.4.2 Méthode de réduction de la contribution du bruit

3.4.2.1 Moyenne des réponses

Afin de réduire la contribution du bruit, la méthode la plus classiquement employée, et également la plus simple, consiste à multiplier les enregistrements pour un même stimulus et de moyenniser ces enregistrements (Blasdel, 1992a, b, Blasdel et Salama, 1986). Étant donné que le bruit physiologique n'est pas synchronisé avec les enregistrements, celui-ci va progressivement s'annihiler au fur et à mesure des répétitions permettant ainsi d'augmenter le rapport signal/bruit de la réponse évoquée. Malgré tout, à elle seule, cette stratégie est insuffisante et/ou nécessite un nombre de répétitions parfois trop important. De plus, augmenter le nombre de présentation s'avère rapidement infructueux dans la mesure où le gain de rapport signal/bruit est relié à la racine carrée du nombre de répétitions.

3.4.2.2 Normalisation

Des méthodes additionnelles ont donc été élaborées pour normaliser le signal par rapport à une activité basale (Bonhoeffer et Grinvald, 1996). Cette activité basale peut être estimée de plusieurs façons :

L'activité du cortex non activé (« blank ») consiste à enregistrer l'activité spontanée lors d'une condition de référence (e.g. un écran gris). Cette approche intuitive, similaire à celle utilisée dans de nombreuses approches neurophysiologiques possède néanmoins un inconvénient majeur : En imagerie

optique, la réponse non spécifique à un stimulus est très forte et n'est pas évaluée avec ce type de méthode.

L'activité du cortex uniformément activé (« cocktail blank ») possède l'avantage de prendre en compte cette activité non spécifique en plus de l'activité basale. Elle consiste cette fois à additionner les réponses de tous les stimuli (Bonhoeffer et Grinvald, 1993). Toutefois, dans le cas où les réponses pour chaque stimulus ne sont pas distribuées uniformément, l'annihilation des réponses spécifiques antagonistes n'est pas complète ce qui peut introduire un biais.

La « soustraction de la première image » consiste à soustraire l'activité de base précédant la stimulation. Les fluctuations du signal lors de l'enregistrement précédant la stimulation peuvent également être prise en compte pour donner plus ou moins d'important au signal (e.g. Z-score, (Gias et al., 2005)).

La soustraction du bruit de basse fréquence spatiale, estimé par une fonction polynomiale a récemment été développée avec succès par (Ribot et al., 2006) comme le montre la figure 17.

Malgré cela, la structure spatiale du bruit reste parfois trop complexe et trop variable ce qui peut limiter l'efficacité des techniques de soustraction du bruit. D'autres traitements, tel que le filtrage spatial, sont donc le plus souvent nécessaires.

3.4.2.3 Filtrage spatial

Comme précédemment décrit, la source principale de signaux non spécifiques se traduit par des bruits de basses fréquences spatiales ainsi que par des zones de forte amplitude au niveau des vaisseaux sanguins dont la structure ne suit à priori pas d'organisation périodique. A l'inverse, les cartes modulaires respectent le plus souvent une organisation périodique plus ou moins robuste. Cette propriété a pu être exploitée dans de nombreuses études par l'emploi de filtres bidimensionnels passe-haut ou passe-bande (figure 17). Avec cette méthode, chaque carte d'activation est convoluée par un filtre maximisant le passage d'une gamme de

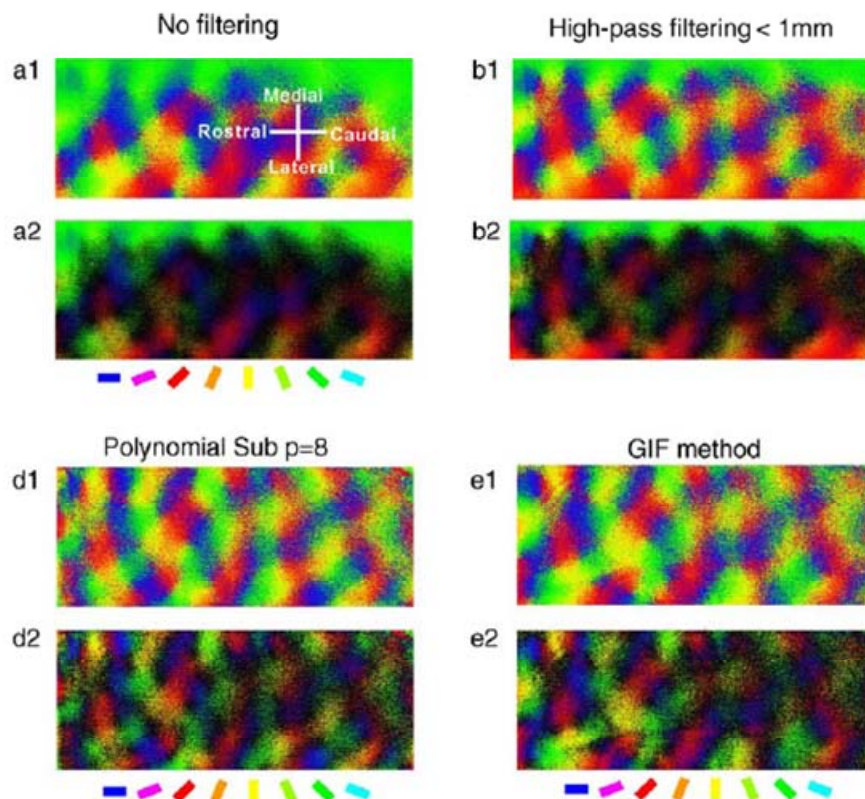


Figure 17. Méthodes de réduction du bruit spatial

Cartes d'orientation (orientation préférée seule, en haut, et normalisée par l'amplitude, en bas) calculée sans filtrage (a), avec un filtrage spatial passe-haut (b), une estimation du bruit par un modèle polynomial (c) et une méthode basée sur l'analyse en composante principale (*Generalized Indicator Function*, GIF, Yokoo et al., 2001) (d). Le bruit de basse fréquence spatiale est particulièrement présent en (a) et (b) (couleur verte). Adaptée de Ribot et al. (2006).

fréquence spatiale (e.g. le plus souvent une différence de "gaussienne" est employée).

En combinaison avec la moyenne d'un nombre suffisant de répétitions, ce type de filtrage est très robuste, simple à mettre en place et est souvent suffisant pour pouvoir exploiter les résultats directement. Toutefois, dans certains cas cette approche peut souffrir de quelques inconvénients :

1- Elle suppose de connaître par avance la périodicité de la carte modulaire étudiée. Elle peut aussi influencer sa structure en "favorisant" une période plus que les autres. Néanmoins, dans la majorité des études (e.g. carte d'orientation) la structure est déjà caractérisée et dans le cas où elle ne l'est pas, elle est facilement déterminable comme cela a été réalisé dans la 2^e étude de cette thèse.

2- Elle considère que la carte est isotrope (i.e. que la période spatiale est identique dans les 2 axes de l'espace, (Ribot et al., 2006)). Il est à noter que cet inconvénient peut être facilement surmonté en augmentant la largeur de bande du filtre ou en utilisant un filtre passe-haut exclusif.

3- En l'absence d'aucune structure modulaire dans le cortex, le filtrage peut faire apparaître une structure périodique artificielle à partir du bruit. Toutefois, l'amplitude de cette organisation artificielle sera faible et variable en fonction du temps. Il convient donc de toujours considérer l'amplitude de la réponse et la "persistance" de la sélectivité (e.g. orientation préférée) en fonction du temps. Ces aspects ont particulièrement été pris en compte dans les études 1 et 2 de cette thèse.

4- Le filtrage spatial peut introduire des "effets de bord" (i.e. artefacts apparaissant sur les bords des images visibles sur la figure 17). L'influence de ces artefacts peut être très facilement réduite en réalisant des régions d'intérêt plus large, comme cela a été fait dans les études de cette thèse grâce à l'emploi de la plus grande chambre d'enregistrement en imagerie optique actuellement utilisée (20 x 27 mm).

Malgré le potentiel du filtrage spatial, ce dernier ne peut être utilisé pour révéler des cartes non-modulaires, telles que les cartes de rétino-topie, ou lorsque la contribution du bruit est trop forte.

3.4.2.4 Analyse en composantes principales

Les approches exploitant les analyses en composantes principales (ou méthodes reliées) ont récemment offert des résultats très prometteurs (voir pour revue : (Sirovich et Kaplan, 2002)). Beaucoup plus complexes à mettre en œuvre que les approches précédentes, elles permettent néanmoins d'être applicable sur n'importe quelle structure de carte d'activation.

Dans le signal, on observe beaucoup de composantes reliées ou non au stimulus et qui n'ont pas le même profil spatiotemporel. Toutes ces composantes peuvent être isolées grâce à l'analyse en composantes principales. Les composantes reliées au stimulus peuvent alors être identifiées et extraites. Dans un premier temps leur isolement s'est fait de manière subjective. Plusieurs améliorations ont donc été apportées pour améliorer l'objectivité de l'identification des composantes (Everson et al., 1997, Everson et al., 1998, Gabbay et al., 2000). Récemment (Yokoo et al., 2001) a proposé une méthode identifiant le profil d'activation applicable au stimulus sans connaître au préalable la forme du signal ou des bruits (figure 17). En parallèle, d'autres approches, basées sur l'analyse en composantes indépendantes ont été développées en se basant sur le fait que les sources de signaux sont indépendantes entre elles (Stetter et al., 2000). Aussi efficaces et astucieuses soient-elles, ces approches restent relativement sophistiquées et lourdes à mettre en place ce qui a sûrement contribué à limiter leur emploi (i.e. la plupart de ces méthodes ne sont par la suite jamais, ou très rarement, exploitées dans des études fonctionnelles en imagerie optique).

3.4.2.5 Stimulation périodique

En parallèle de ces précédentes approches, des stratégies basées sur l'analyse temporelle ont vu le jour (Sornborger et al., 2003, Sornborger et al., 2005). Parmi elle, la "stimulation périodique" proposée par (Kalatsky et Stryker, 2003) offre une simplicité d'emploi qui, par la suite, a probablement participé à son succès dans de nombreuses études en imagerie optique. Cette méthode, développée initialement pour les acquisitions en IRMf (Engel et al., 1994, Boynton et al., 1996), consiste à présenter périodiquement le stimulus et, via une transformée de Fourier du signal enregistré, récupérer la réponse évoquée à la fréquence de stimulation (voir pour revue : (Kalatsky, 2009)).

Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet d'extraire la réponse évoquée à une fréquence choisie pour ne pas correspondre aux gammes de

fréquences des bruits périodiques vasculaires : mouvements cardiorespiratoires et ondes de Mayer. La discrimination du signal parmi le bruit devient donc importante (i.e. augmentation du rapport signal/bruit de l'ordre de 10x selon (Kalatsky et Stryker, 2003)) ce qui permet de réduire considérablement la durée des enregistrements. Un deuxième avantage est que l'activité basale est présente dans la composante DC et les basses fréquences de la transformée de Fourier et n'est donc plus présente dans le signal évoqué. De ce fait, aucune normalisation n'est à priori nécessaire.

La "stimulation périodique" représente donc un outil très efficace pour extraire le signal. Dans le chapitre suivant, nous verrons qu'en présentant plusieurs stimuli de manière continue (*stimulation continue*), il sera possible d'estimer très efficacement et simplement la sélectivité pour chaque pixel (e.g. rétinopathie, orientation, ...).

3.5 Mesure de la sélectivité

La réponse à un stimulus obtenu au travers des *cartes d'activation* reste limitée en contenu d'information. Dans ce chapitre, les réponses obtenues pour plusieurs stimuli vont être combinées via différentes méthodes d'analyse pour réaliser des *cartes de sélectivité* (e.g. orientation préférée).

3.5.1 Rétinopathie

Initialement, pour réaliser les cartes de rétinopathie en imagerie optique, l'analyse était réalisée à partir de cartes d'activation obtenues en réponse à des stimulations circonscrites du champ visuel (le plus souvent des réseaux de barres dans des carrés à différentes positions, figure 18). Ensuite, pour chaque pixel, la position visuelle préférée était estimée, le plus souvent en déterminant quelle position spatiale évoquait la plus forte réponse (Gias et al., 2005, Schuett et al., 2002).

Toutefois, le nombre limité de positions stimulées (généralement moins d'une vingtaine) rend cette méthode faiblement résolutive et les bordures entre les différentes zones rétinotopiques peuvent être très sensibles à l'intensité des activations et leur étendue spatiale (Schuett et al., 2002). De plus, les cartes d'activations nécessaires à cette méthode sont souvent affectées par du bruit physiologique difficile à éliminer (voir chapitre précédent).

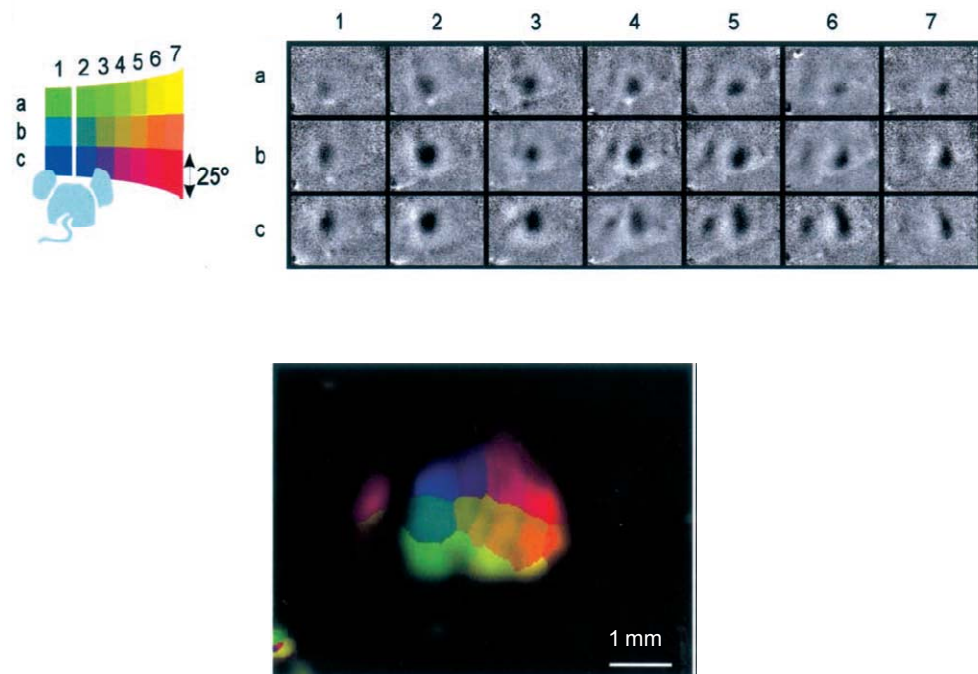


Figure 18. Rétinotopie du cortex de la souris mesurée par stimulation épisodique

(en haut) Activations corticales chez la souris (en noir) évoquées par la stimulation de différentes portions du champ visuel. (en bas) Pour chaque pixel, la détermination de la position évoquant la plus forte réponse a permis d'obtenir la carte de rétinotopie (code couleur, en haut à gauche). Adaptée de Schuett et al. (2002).

L'utilisation de la stimulation continue par (Kalatsky et Stryker, 2003) a donc permis de réduire considérablement la contribution du bruit tout en augmentant la résolution spatiale de la rétino-topie. Cette méthode se base sur des enregistrements en continu du cortex en réponse à des barres horizontales ou verticales en déplacement périodique dans le champ visuel (figure 19). Pour chaque pixel du cortex visuel, une réponse périodique est donc induite. L'amplitude de la réponse à la fréquence de stimulation (i.e. 1e harmonique), obtenue grâce à une transformée de Fourier, peut alors être utilisée pour mesurer la puissance du signal.

De plus, en fonction de la localisation des pixels dans le cortex, la réponse périodique est plus ou moins décalée dans le temps en fonction de la position rétino-topique des champs récepteurs des neurones sous-jacents. Cette phase du signal, obtenue également grâce à la transformée de Fourier peut alors être utilisée pour mesurer la position préférée de chaque pixel. Étant donné qu'une infinité de position du champ visuel sont stimulées à tour de rôle par le passage de la barre, cette méthode permet d'accéder à une excellente résolution (figure 20).

Il est à noter que les cartes de phase obtenues, ne correspondent pas exactement à la carte de rétino-topie pour deux raisons : (1) La stimulation continue ne peut être employée que pour des paramètres continus à 1 dimension tel que l'orientation ou la rétino-topie selon l'azimut ou l'élévation. Ainsi, pour obtenir une carte de rétino-topie complète, deux enregistrements sont nécessaires. (2) La phase permettant de mesurer la position rétino-topique est retardée par le délai hémodynamique inhérent à l'imagerie optique. Ce sont donc des cartes relatives qui sont obtenues avec cette méthode, mais qui restent tout à fait exploitable dans la majorité des études réalisées. Malgré tout, ce délai peut être facilement estimé et retiré en réalisant deux enregistrements successifs dans lequel les barres se déplacent dans des directions opposées (voir la méthodologie dans (Kalatsky et Stryker, 2003, Kalatsky, 2009)).

3.5.2 Orientation

Pour obtenir les cartes de sélectivité à l'orientation en imagerie optique, l'analyse est réalisée à partir de cartes d'activation obtenues en réponse à plusieurs stimuli orientés (généralement des réseaux de barres). La méthode de "somme des vecteurs" est alors la plus souvent utilisée (Bonhoeffer et Grinvald, 1996, 1991,

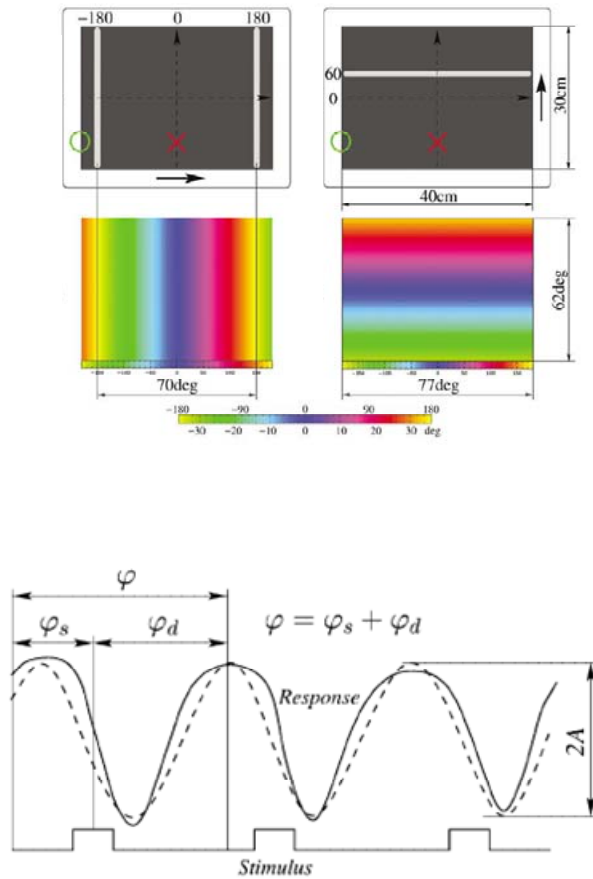


Figure 19. Paradigme de stimulation périodique

(en haut) Stimuli utilisés dans le paradigme de stimulation continue pour cartographier la rétinitopie selon l'azimut (à gauche) ou l'élévation (à droite). (en bas) En chaque point du cortex, la réponse neuronale est retardée en fonction de la position des champs récepteurs (φ_s) et le délai hémodynamique (φ_d). La transformée de Fourier de ce signal permet alors d'estimer la *phase* (φ) et la *force* de la réponse ($2A$). Adaptée de Kalatsky et Stryker (2003).

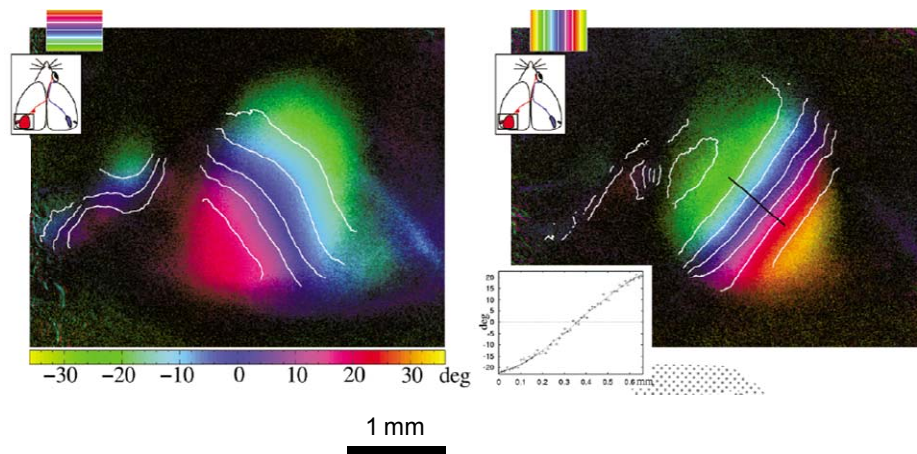


Figure 20. Rétinotopie du cortex de la souris mesurée par stimulation périodique

Cartes de rétinotopie dans l'axe de l'élévation (à gauche) et de l'azimut (à droite) dans le cortex visuel de la souris à l'aide du paradigme de stimulation continue. Adaptée de Kalatsky et Stryker (2003).

Blasdel et Salama, 1986). Elle consiste à calculer pour chaque pixel, le vecteur d'orientation moyen (dans un espace polaire) à partir des amplitudes évoquées pour chaque orientation. Cette méthode permet ainsi d'estimer, pour chaque pixel, l'orientation préférée (présentée sous la forme d'une carte en couleur) et l'amplitude de la réponse à l'orientation (présentée sous la forme d'une carte en niveau de gris, voir la figure 17). Une alternative découlant de cette méthode est "l'analyse différentielle". Dans ce cas, les cartes d'activation correspondant à deux orientations orthogonales sont soustraites, laissant apparaître les modules d'orientation en noir et blanc selon la préférence pour l'une ou l'autre des orientations orthogonales. Ces techniques permettent d'obtenir d'une manière très simple une mesure fiable de la sélectivité à l'orientation. Malgré cela, certains paramètres comme la largeur de bande pour l'orientation ne peuvent pas être estimés directement.

En modélisant la courbe de réponse à l'orientation, il est par contre possible de mesurer l'orientation préférée et l'amplitude, mais également la largeur de bande pour chaque pixel (Swindale et al., 2003, Swindale, 1998b, Carandini et Sengpiel, 2004). En utilisant cette stratégie, (Swindale et al., 2003) ont pu modéliser la courbe de réponse par une fonction de Von Mises et constater que la largeur de bande était plus large dans les "pinwheel" que dans les domaines d'orientation.

Toutefois, ces stratégies nécessitent de modéliser les résultats expérimentaux par des fonctions mathématiques qui peuvent ne pas décrire parfaitement les processus naturels. Il convient donc de prendre en compte autant que possible la "qualité" de la description par le modèle en mesurant par exemple les "écarts au carré".

Qu'il s'agisse de la modélisation par une fonction ou de la somme des vecteurs, le nombre de cartes d'activations utilisées dans le calcul a une influence sur la résolution polaire des mesures. (Womelsdorf et al., 2001) ont par exemple montré que huit orientations seraient nécessaires pour estimer adéquatement la sélectivité à l'orientation malgré que la plupart des études se limitent souvent à quatre. Enfin, même si le signal pour l'orientation est relativement "fort" dans le cortex visuel primaire, son amplitude peut être plus faible dans d'autres situations telles que dans l'aire 21a comme cela sera exposé dans l'étude 2.

L'approche de "stimulation continue", présentée précédemment pour la rétinitopie, représente donc un atout de taille dans la mesure où elle permet

d'accéder à une meilleure résolution (i.e. polaire), tout en augmentant le rapport signal/bruit. En présentant un réseau de barre, dont l'orientation changeait de manière continue et en exploitant la réponse à la 2^e harmonique (i.e. l'orientation préférée est présentée 2 fois dans une rotation complète), (Kalatsky et Stryker, 2003) ont été en mesure de réaliser des cartes d'une qualité exceptionnelle en 10x moins de temps qu'avec les techniques traditionnelles (figure 21).

Malgré les performances offertes par cette technique, dans toutes les études exploitant la "stimulation continue" (rétinotopie et orientation), l'analyse du signal ne se concentre toujours que sur une seule harmonique ce qui empêche toute estimation du profil de la réponse. Les articles 3a et 3b de cette thèse vont se concentrer sur cet aspect.

3.5.3 Direction

Les premières cartes de sélectivité à la direction en imagerie optique ont été réalisées en employant la méthode de "somme des vecteurs" à partir de cartes d'activation obtenues en réponse à plusieurs stimuli en mouvement (réseaux de barres ou points aléatoires, (Shmuel et Grinvald, 1996)). De la même façon que pour l'orientation, les "cartes différentielles" peuvent également être réalisées en soustrayant les cartes d'activation correspondant à deux directions opposées : il est ainsi possible de voir que dans un domaine d'orientation, coexistent des sous-domaines de directions opposées et orthogonales à l'axe de l'orientation.

Toutefois, le signal évoqué par la direction est plus faible que celui de l'orientation (Shmuel et Grinvald, 1996). De plus, le profil de la courbe de direction est bimodal. Ainsi lorsque les amplitudes des réponses à des directions opposées sont proches et que le niveau de bruit est fort, la direction peut être mal évaluée (figure 22). (Kisvarday et al., 2001) ont donc proposé d'estimer la direction en identifiant la réponse maximum plutôt que la réponse moyenne de la « somme des vecteurs ». Néanmoins, cette alternative rend la résolution angulaire plus faible.

(Swindale et al., 2003) ont donc proposé une alternative judicieuse en modélisant la courbe de réponse à la direction par une somme de deux fonctions de Von Mises (figure 8). Cette méthode a permis de mesurer avec succès l'organisation des cartes de direction en conjonction de celles pour l'orientation dans le cortex visuel primaire du chat. Elle a également permis le calcul d'un index de direction indépendant de l'amplitude du signal. Avec cette mesure, il a ainsi été possible de

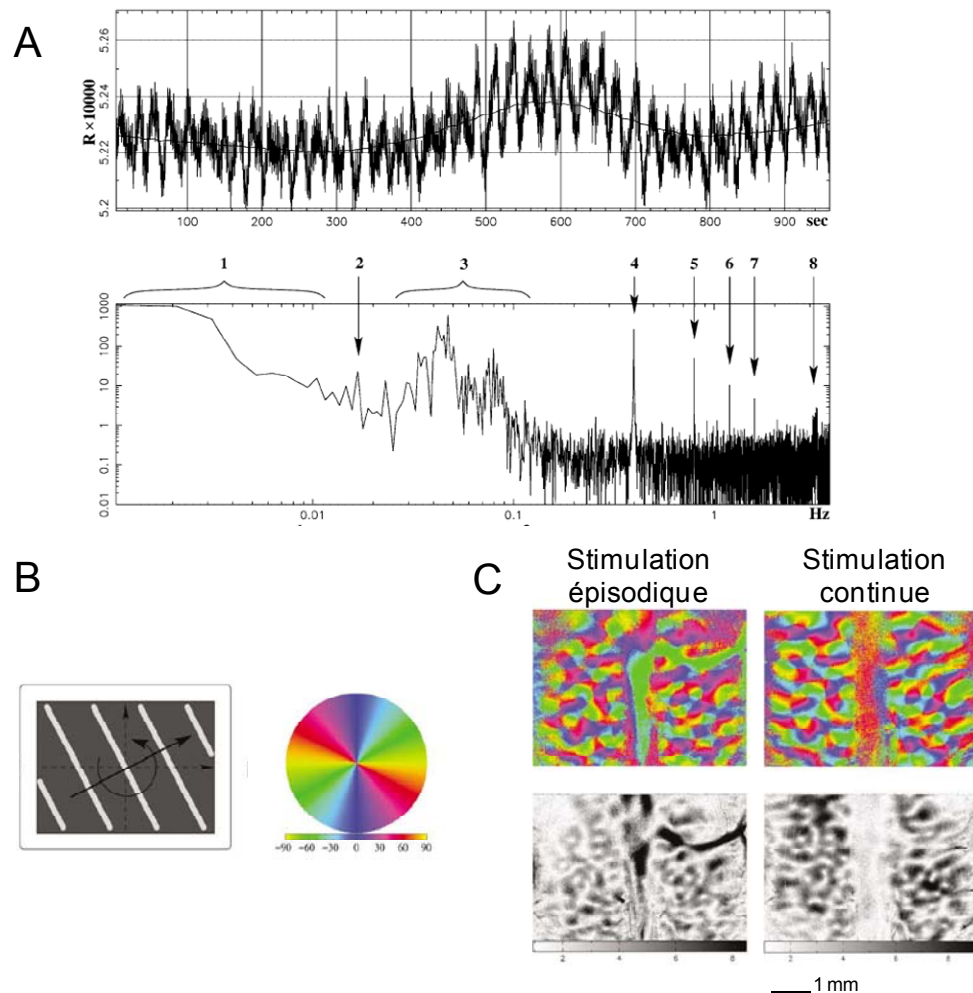


Figure 21. Cartes d'orientation dans le cortex du souris mesurées par stimulation périodique

(A) Réponse dans le temps et dans le domaine fréquentiel au niveau d'un pixel dans le cortex visuel primaire du chat. La réponse à la stimulation est indiquée par le « 2 », les ondes de Mayer « 3 », la respiration « 4 » et les harmoniques des battements cardiaques « 5, 6, ... ». (B) Schéma de la stimulation utilisée pour cartographier l'orientation : un réseau de barre dont la direction changeait de manière continue (rotation anti-horaire) (C) Cartes de préférence (haut) et d'amplitude (bas) pour l'orientation en stimulation épisodique (gauche, durée d'enregistrement = 1h) ou périodique (droite, 2 min). Adaptée de Kalatsky et Stryker (2003).

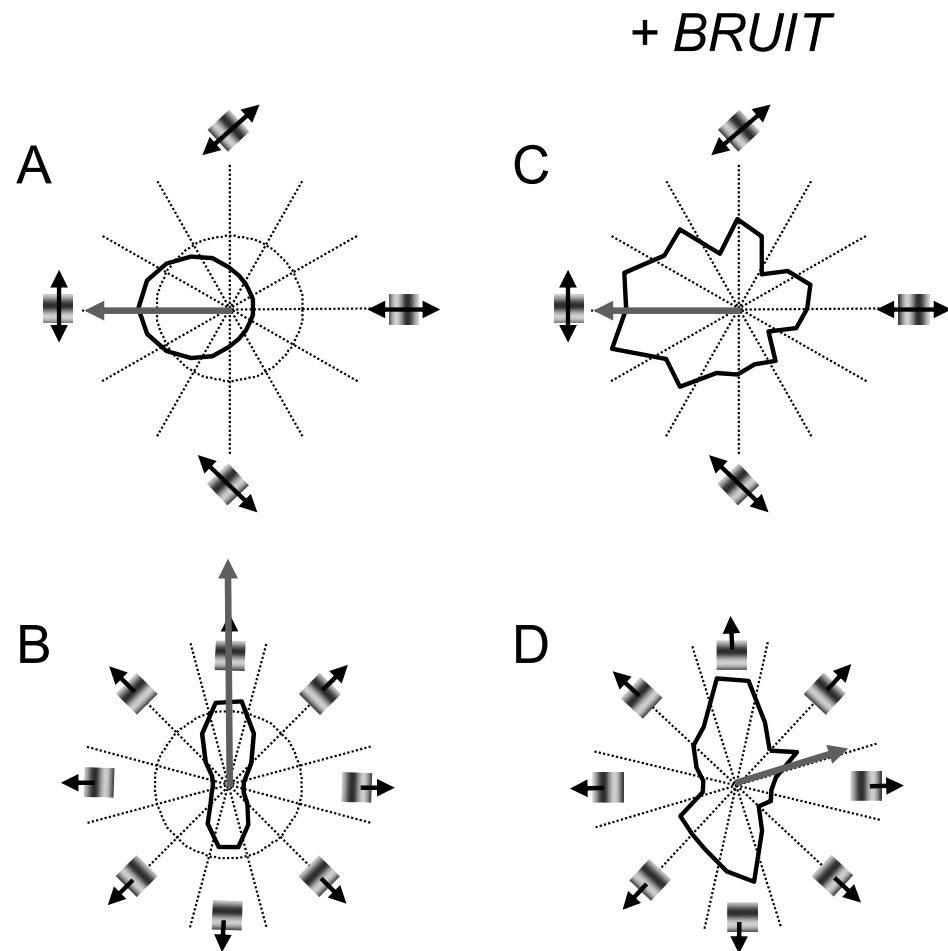


Figure 22. Mesure de la sélectivité à l'orientation et à la direction

Réponse théorique à l'orientation (A) et à la direction (B). Ces réponses ont été additionnées de bruit en (C) et (D). Les sommes des vecteurs sont indiquées par les flèches grises. La nature unimodale de la réponse à l'orientation rend le calcul de la somme des vecteurs particulièrement robuste (comparer A et C). Pour la direction, la nature bimodale de la réponse peut introduire un biais dans les mesures lorsque la sélectivité est faible (comparer B et D). Inspirée de Kisvarday et al. (2001).

constater que l'index de direction était plus faible au niveau des fractures entre les domaines de direction opposées.

Malgré tout, cette dernière approche souffre, comme c'était le cas pour l'orientation, d'une résolution polaire insuffisante et d'un rapport signal/bruit souvent trop faible. Ainsi, l'estimation précise des cartes de direction en imagerie optique reste encore aujourd'hui un enjeu de taille. L'objectif de l'étude 3b de cette thèse va être d'adapter le protocole de stimulation continue pour évaluer la sélectivité à la direction.

4. Objectifs

La première partie des objectifs de cette thèse a tout d'abord été d'alimenter les connaissances sur la caractérisation et la mise en évidence des cartes corticales chez le chat. Les résultats produits permettront d'aider à mieux comprendre les facteurs qui déterminent la présence ou non d'une organisation corticale dans une structure donnée. Toutes les études réalisées dans cette thèse ont été effectuées sur le chat anesthésié à l'aide de l'imagerie optique des signaux intrinsèques qui offre jusqu'à maintenant le meilleur compromis résolution spatiale vs. surface d'enregistrement.

Article 1 : carte de modulation par le pourtour dans le cortex visuel primaire

La suppression centre/pourtour est une propriété importante dans l'élaboration de la perception des objets dans leur environnement. L'objectif de cette étude est de mesurer la réponse en fonction de la taille de la stimulation en chaque point du cortex visuel primaire et d'évaluer la force de la suppression. Notre hypothèse est que si une organisation en domaine de forte et faible suppression est révélée pour cette propriété, cela pourrait suggérer une optimisation de ce type d'analyse au sein d'une structure de bas niveau.

Article 2 : cartes fonctionnelles dans l'aire 21a

L'aire 21a semble être une structure majeure de la voie ventrale et de ce fait, peu engagée dans des processus d'analyse du mouvement. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'organisation modulaire pour la direction et l'orientation dans l'aire 21a en comparaison avec les aires 17 et 18 enregistrées simultanément. Notre hypothèse est que si aucune organisation modulaire n'existe pour la direction, cela

pourrait suggérer que cette propriété n'est pas favorisée ce qui supporterait l'engagement de l'aire 21a dans la voie ventrale.

La deuxième partie des objectifs de cette thèse a été de travailler sur les aspects quantitatifs en imagerie optique. La *stimulation continue* est une nouvelle approche qui permet d'augmenter considérablement le rapport signal/bruit des enregistrements. Toutefois, l'analyse ne se base que sur la quantification d'une seule harmonique et ne prend pas en compte le couplage neuro-hémodynamique. C'est ce qui a jusqu'ici limité son emploi à l'analyse de la rétinitopie et des cartes d'orientation uniquement. Deux études ont donc été réalisées afin d'apporter de nouvelles possibilités à cette approche :

Article 3a : cartes de réponse hémodynamique et de population de champs récepteurs

Dans cette étude, le couplage neuro-hémodynamique va être pris en compte et le profil du signal périodique évalué en réponse à une stimulation unimodale (des barres en mouvement périodique dans le champ visuel). Notre hypothèse, soutenue par le développement d'un modèle, est que les hautes harmoniques contiennent de l'information quant à la taille des champs récepteurs des neurones.

Article 3b : cartes de directions en stimulation continue

Contrairement à la précédente étude, nous allons considérer ici une stimulation bimodale, telles que la réponse à deux mouvements opposés. Notre hypothèse dans ce cas, est que la première harmonique est reliée à la direction et la seconde, à l'orientation des stimuli.

ARTICLE 1

En préparation pour Neuroimage

Surround Suppression Map in the Cat Primary Visual Cortex

M. P. Vanni^{1,2} and C. Casanova¹

¹ Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Christian Casanova
Laboratoire des Neurosciences de la Vision
École d'optométrie
Université de Montréal
CP 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7
Tel. (514) 343-2407
Fax. (514) 343-2382

Web: <http://www.opto.umontreal.ca/neurosciences/>

Keywords : area 17, area 18, cat, intrinsic signals, orientation selectivity, spatial frequency, visual cortex, cortical map, center surround, suppression, receptive field, point spread, visuotopy.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by CIHR MOP-14825 grant to C.C. FRSQ provided part of C.C.'s salary (chercheur national program). M.P.V. was supported in part by "Foreign Affairs and International Trade" and "Faculté des études supérieures" fellowships. We also thank Karine Minville for her helpful comments.

ABSTRACT

It is well established that a stimulus presented outside of the receptive field can suppress the response when presented in conjunction with stimulation within the receptive field at the same orientation. In this study we used optical imaging of intrinsic signal to spatially evaluate surround suppression in the cat primary visual cortex. The orientation vector's magnitude was measured for different diameters in areas 17 and 18 at different eccentricities. Delimited regions of some millimeters in the cortex were revealed by constricted stimulations in the visual field (i.e. "point spread"). Increasing the diameter of this stimulation increased the spread of this cortical activation. In the "point spread", the optimal stimulation diameter and the suppression were evaluated. In 3/4 of pixel, surround suppression profiles were observed. Compared to area 18, the optimal stimulation diameter found was smaller in area 17 where receptive field are known to be smaller (A17: 22deg, A18: 35 deg). No difference in the suppression strength was observed between both areas (~25%). In some cases, pixels with high suppression were organized in periodic domains with a modular size comparable to the one of orientation domains. Results presented here show that surround modulation can be truthfully quantified by optical imaging and appears to be organized in low and high suppression domains in primary visual cortex of the cat. This modular organization for surround modulation in a low level area can be compared to the ones found in a high level area in primates (i.e. area MT).

INTRODUCTION

It is well established that stimulation of the areas beyond the classical receptive field (cRF) can modulate the responses of neurons in the primary visual cortex (Akasaki et al., 2002; Cavanaugh et al., 2002a, b; DeAngelis et al., 1994; Fitzpatrick, 2000; Gilbert, 1977; Levitt and Lund, 1997; Polat et al., 1998; Sengpiel et al., 1997). The effects observed are either facilitatory or suppressive, the latter being maximal when the area surrounding the cRF is stimulated with a grating at the neuron's preferred orientation and optimal spatial frequency (REF). The mechanisms subtending surround interactions are not totally understood but are likely to come from a combination of intracortical interactions, feedback signals from higher-level areas, and feed-forward inputs from the lateral geniculate nucleus (LGN) (Angelucci et al., 2002; Das and Gilbert, 1995; Durand et al., 2007; Naito et al., 2007; Ozeki et al., 2004; Toth et al., 1996; Wielaard and Sajda, 2006).

Surround modulations were also reported in higher-order areas such as the middle temporal cortex (MT) of monkeys (Allman et al., 1985) and the lateral suprasylvian sulcus of cats (von Grunau and Frost, 1983). In area MT, a spatial organization of the suppressive effects on motion was reported (Born, 2000; Born and Tootell, 1992) as full-field random-dot patterns provoked the appearance of densely and lightly labeled spots of 2-deoxyglucose. Single cell recordings indicated that neurons' discharges in lightly labeled spots were suppressed by the full screen stimulation while responses of neurons located in the dense patches were enhanced. These findings suggested the existence of domains for global and local in area MT. No such spatial organization for center /surround interactions was reported in the primary visual cortex.

In the present study, we investigated the possibility the surround interactions in the primary visual cortex are spatially organized using intrinsic signal optical imaging. This method has been successfully used to reveal visuotopic, orientation and direction maps in the primary visual cortex (Shmuel and Grinvald, 1996, 2000; Vanni et al., 2010). Optical imaging is sensitive enough so that stimuli of restricted size can evoke significant optical responses on a delimited portion (i.e. the "point spread") of the cat primary visual cortex (Das and Gilbert, 1995; Toth et al., 1996). Toth *et al.* (1996) further demonstrated,

by comparing responses to a localized and a full-field stimulus, that center-surround interactions can be quantified by optical imaging.

The present study had two goals. The first was to evaluate in more details suppressive interactions in both areas 17 and 18, by presenting stimuli of increasing size at different eccentricities, thus for different receptive field sizes. The second was to investigate the possibility that a spatial organization for suppression exists in the cat primary visual cortex. Response profiles for stimulus diameters were analyzed for each “point spread” pixel and optimal-diameter and suppression maps were compared to orientation maps. Part of this work has been previously published in abstract form (Vanni and Casanova, 2006).

METHODS

Animal preparation

Thirteen female adult cats weighing between 2.45 – 3.95 kg were used in this study. Several of these animals were also used to collect data for other studies (Vanni et al., 2010; Vanni et al., submitted). All procedures were made in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals, and the experimental protocol was accepted by the Ethics Committee of the Université de Montréal. Throughout the experiments, the cats were placed in a stereotaxic frame and artificially ventilated with a mixture of halothane (Fluothane®, 0.6 – 0.8 %) in O₂/N₂O (30% / 70%). Muscular relaxation was obtained by the continuous injection of gallamine triethiodide (2%) infused with 5% dextrose in a lactated Ringer’s injection solution. End-tidal CO₂, blood pressure, blood oxygen saturation, core temperature, electroencephalogram and electrocardiogram were continuously monitored to evaluate the depth of anaesthesia and the animal welfare. Pupils were dilated with atropine sulfate 1% (Isopto®) and the eyes were protected using contact lenses of appropriate refractive power (+2). An antibiotic (Tribissen 24%, 0.125 mL/kg/day) was injected s.c. to prevent infections. Large craniotomies (see Villeneuve et al., 2009) were performed over the primary visual cortex including area 17 and 18 and the dura was removed to access the cortex. The chamber frame was attached to the skull with dental cement and filled with

silicone oil (Polydimethylsiloxane, 200® fluid, viscosity 350 cSt, Sigma-Aldrich, inc). At the end of each experiment, the animals were euthanized by an injection of sodium pentobarbital (Euthanyl, 100mg/kg).

Acquisition and stimulation

The cortex was illuminated at 545 nm to reveal the vascular pattern of the cortical surface and at 630 nm to record the intrinsic signals. Images were recorded with a 12 bits CCD camera (1M60, Dalsa, Colorado Springs, USA) fitted with a macroscopic lens (Nikon, AF Micro Nikkor, 60mm, 1:2.8D). Visual stimuli were generated using a custom made software (STIMPlus) and presented on a 21-in computer screen placed 19 cm in front of the cat's eyes and subtending 120 x 90 deg of visual angle. Stimuli were stationary drifting sine-wave gratings (0.05 to 0.6 c/deg, mean luminance = 25 cd/m²) displayed monocularly and moving at a temporal frequency of 2 or 4 Hz. The spatiotemporal parameters were chosen to optimize activation and delimit borders between areas 17 or 18 (Vanni et al., 2010; Vanni et al., submitted; Villeneuve et al., 2009). Gratings moving in different directions (4 or 8 different values) and at varying sizes (4 to 12 circles from 2 deg diameter to full-screen stimulation) were presented pseudo-randomly. To predict the position of the center of activation, visuotopic maps were previously acquired by a continuous stimulation paradigm (Vanni et al., submitted) or by stimulating with grating confined in vertical or horizontal bars placed at different positions in the visual field (Bosking et al., 2000). Each stimulus were presented during 8s (sampling frequency = 0.6 Hz) and spaced by a 10s interval during which the next stimulus was presented but remained immobile. The blind spot was back projected on the computer screen with a light source and used to determine the position of the *area centralis* (Bishop et al., 1962).

Offline processing

The data was imported into Matlab (The Mathworks, Natick, MA) for further analysis. Trials (averages of 30-40 trials) were summed for the same-orientation-opposite-direction and band-pass filtered to remove low and high frequency noise which affects the modular organisation. Pass-band cutoffs

were chosen according to the periodicity of the orientation domains as described in (Villeneuve et al., 2009). Large blood vessel locations were identified from anatomical pictures and were not considered in the analysis. Then, signal amplitude were measured by vector averaging of responses or orthogonal differential responses (Bonhoeffer and Grinvald, 1996; Shmuel and Grinvald, 1996). For each pixel, the profiles of the orientation strength for stimulus diameter were fitted by a “ratio of Gaussian” (Cavanaugh et al., 2002a; Sceniak et al., 2001; Tailby et al., 2007). The function adapted from (Tailby et al., 2007) was:

$$ROG_d = \frac{k_e \operatorname{erf}\left(\frac{d}{w_e}\right)}{1 + k_i \operatorname{erf}\left(\frac{d}{w_i}\right)}$$

Where d is stimulus diameter, k_e and w_e are the gain and spatial extent of the excitation center mechanism respectively, k_i and w_i are the gain and spatial extent of the inhibition surround mechanism and erf is the error function. The diameter default value attributed to full-screen stimulation for the fit was 90 deg. The nature of the function apart, the fitted computing procedure was the same as described in (Villeneuve et al., 2009) for spatial frequency evaluation. The optimal stimulus diameter was the diameter of the fitted curve associated with the maximum and the suppression was defined by:

$$\text{Suppression} = 100 \cdot \frac{M_{FS} - M_{OD}}{M_{OD}}$$

Where M_{OD} and M_{FS} were the magnitude of the fitted curve for the optimal diameter and full screen stimulation respectively. The limits of the cortical activation were determined by a method adapted from (Villeneuve et al., 2009): The differences between the preferred orientations at each diameter and the full screen stimulation (reference map) were calculated. Only pixels having a difference less than 22.5deg were considered reliable and part of the cortical activation. The “point spread” for quantification in areas 17 and 18 were cortical activations obtained with stimulus diameters of 8 and 12 deg,

respectively. Pinwheel orientation locations, high and low optimal diameter and suppression region borders were determined by the 2D-gradient as described in (Vanni et al., 2010).

Shuffle analysis and statistics

Correlations coefficients were calculated between orientations for both optimal-diameter and suppression maps but also between optimal-diameter or suppression maps themselves. Considering the large number of pixels, the statistical inference (p) is not valid and was not shown. However, the distribution of r values can be compared to another distribution obtained from the same dataset in which diameters values have been mixed to remove the surround contribution. Consequently, optimal-diameter or suppression values calculated from these shuffled dataset result only from cortical fluctuations. Then, paired t-test were used to infer or not the hypothesis of a correlation with statistical conclusion.

RESULTS

Visuotopic map and “point spread”

All activation positions in the present study were visuotopically defined. Figure 1 shows an example of visuotopic mapping in area 18 for animal case #1. In a large region of interest (panel A), orientation domains evoked by full field grating stimulation was clearly visible in the anterior part of the differential map (panel B). By confining the gratings in horizontal bars at different positions, it was possible to reveal the visuotopy along elevation (panels C). As described by others, the main part of the primary visual cortex accessible for imaging corresponded to regions representing the central and lower parts of the visual field (Tusa et al., 1978; Tusa et al., 1979; Vanni et al., submitted). A drift of visuotopic activation (indicated by the arrow) along the elevation was seen in the antero-posterior axis with the lower part of the visual field represented in the anterior part of the visual cortex. By confining grating in vertical bars in different positions, it was possible to reveal the visuotopy

along azimuth showing the contralateral representation of the visual field in both hemispheres (panels D). Finally, by confining the grating in a circle at a specific position of the visual field, it was possible to activate a restricted region of the cortex, the “point spread”, in accordance to the visuotopy (panel E). In the following sections, the “point spread” activation is further explored as a function of the stimulus diameter, stimulus eccentricity and the cortical area (17 or 18).

Area 18 responses as a function of stimulus diameter

Figure 2 shows an example of activation spread with increasing stimulus diameter in area 18 of animal case #2. In a region of interest (panel A), orientation maps for 6 stimulus diameters are shown (panels B-G). The activation spread, indicated by a white outline, increased with stimulus diameter: for small circles (panels B and C, 6 and 12 deg), activation was confined in an area of some millimeters in the anterior and right part of the cortex. For larger circles (panels D-G, >18deg), activation became bilateral and invaded the posterior part of the cortex. The quantitative evaluation of the surface, length and width of the “point spread” was not possible in all experiments because the complete boundaries of the activation zone borders were not always visible within the chamber. Nevertheless, we notice that the surface of activation decreased with eccentricity, as expected from the reduction of the “cortical magnification factor”. It is important to note that, despite the long duration of the recording session (more than 8 hours), no variation in the orientation maps was observed (data not shown).

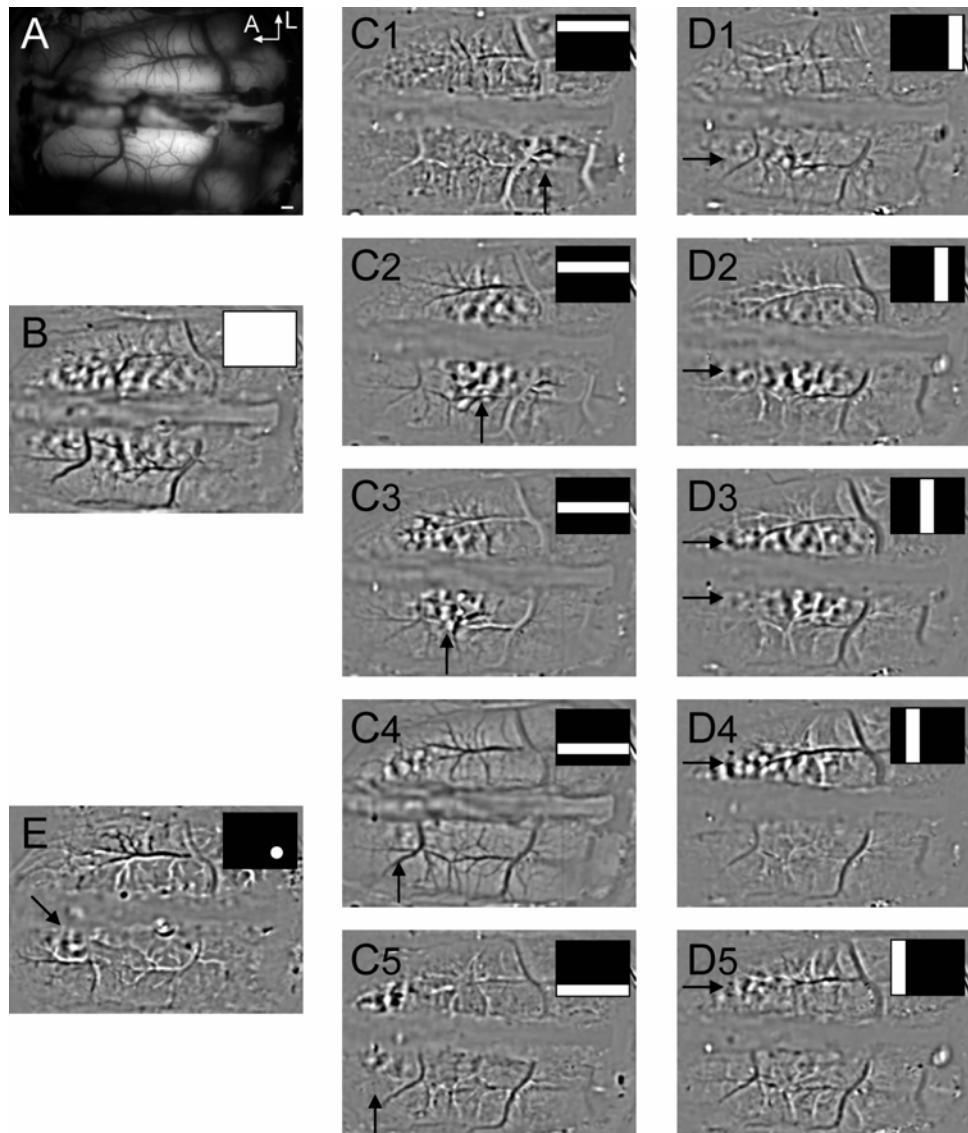


Figure 1. Visuotopic map and “point spread”.

(A) Vasculature pattern in the region of interest (ROI) of the visual cortex. (B) Differential map evoked by full screen grating (4Hz, 0.15cpd). (C) Differential maps evoked by gratings confined in 12 deg large horizontal bars at different elevations (+5, -7, -19, -31 and -43 deg). Black arrows indicate visuotopic activations. (D) Differential map evoked by gratings confined in 12 deg large vertical bars at different azimuths (+20, +10, 0, -10 and -20deg). (E) Differential maps evoked by gratings confined in a 12 deg circle at elevation of -27 deg and azimuth of -20 deg. Scale bar = 1mm. The white regions in the offsets represent the extent and location of the drifting gratings.

While the “point spread” could not be quantitatively estimated, the orientation vectors could be measured with confidence. Figure 3 shows characteristic responses in three locations (dot symbols in figure 2). Panel A displays the preferred orientation as a function of stimulus diameter for two positions in the “point spread” and for one located outside. Within the “point spread”, the measures of preferred orientation were very stable for every stimulus diameter used (black and white dots graphs). However, measures outside the “point spread” became variable for smallest diameters (gray dots graph, compare values under and above 18 deg). This could be explained by the absence of a cortical activation in this location for stimulus smaller than 18 deg (i.e. under 18 deg, the preferred orientation estimation came from noise fluctuations). Panel B displays signal amplitude as a function of the stimulus diameter. In the “point spread”, some pixels, such as that identified by the black symbol in figure 2, had a maximum response for full field stimulation. For other pixels, such as that identified by the white dot in figure 2, the response was maximal for intermediate diameters and full screen stimulation decreased discharges level. Finally, outside the “point spread” the signal magnitude was null for the smallest diameters because of the absence of cortical activation. To further explore responses to varying stimulus sizes at every locations of the “point spread”, amplitude were fitted by a function described in method.

For each pixel, optimal diameters and suppressions values were measured from the fitted curves to reveal maps (figure 4). Panel A and B displays the optimal diameter and suppression maps in the “point spread” observed for a 12 deg stimulus diameter. In 15% of pixels, optimal diameters consisted of full field stimulation (brown pixels) without any suppression (deep blue pixels). Panel C displays the distribution of optimal diameters and suppressions in the “point spread”. For pixel with surround suppression, the mean optimal diameter was 38 deg and the mean suppression was 15 %.

Area 17 responses as a function of stimulus diameter

The increase of the spread of activation, magnitude response profile and suppression distribution could also be observed in area 17. Figure 5 displays results obtained in animal case #3. Panel B shows a clear orientation map in the region of interest evoked by an 8 deg stimulus diameter. Panel C displays the responses for six stimulus diameters. As for area 18, the spread of activation increased with stimulus size. However, responses could be detected for smaller diameters (e.g. note the strong activation for 4 and 8 deg in panel C1 and C2 in comparison to the weak activation in area 18 for 6 deg in figure 2, panel B). Panel D displays the relation between response magnitude and stimulus diameter in two locations in the “point spread”. As in area 18, some locations had a maximum response for full field stimulation (white dots) and others for intermediate diameters (black dots). Optimal diameter and suppression maps are shown in panels E and F, respectively. A structure similar to that in area 18 was observed: in 14% of pixels, optimal diameters consisted on the full field stimulation without any suppression. For others pixels, the mean of optimal diameters was smaller than that found in area 18 (17 deg). Mean suppression was 27 %.

Interaction between optimal diameters, suppressions values and eccentricity

To calculate mean values and reveal relationship with RF sizes, optimal diameters and suppressions values were measured in 40 independent tests at different eccentricities in areas 17 and 18. When four orientations were used to calculate orientation magnitude, optimal diameters and suppressions could be measured with confidence in every part of the cortex because every orientation modules were assumed to be activated (i.e. in contrast, when two cardinals orientations were presented, oblique modules could not be well activated and then, optimal diameters and suppressions values could, to some extent, be erroneous in these modules). The measures of the proportion of surface without any suppression could be affected in these previous situations and was then not considered.

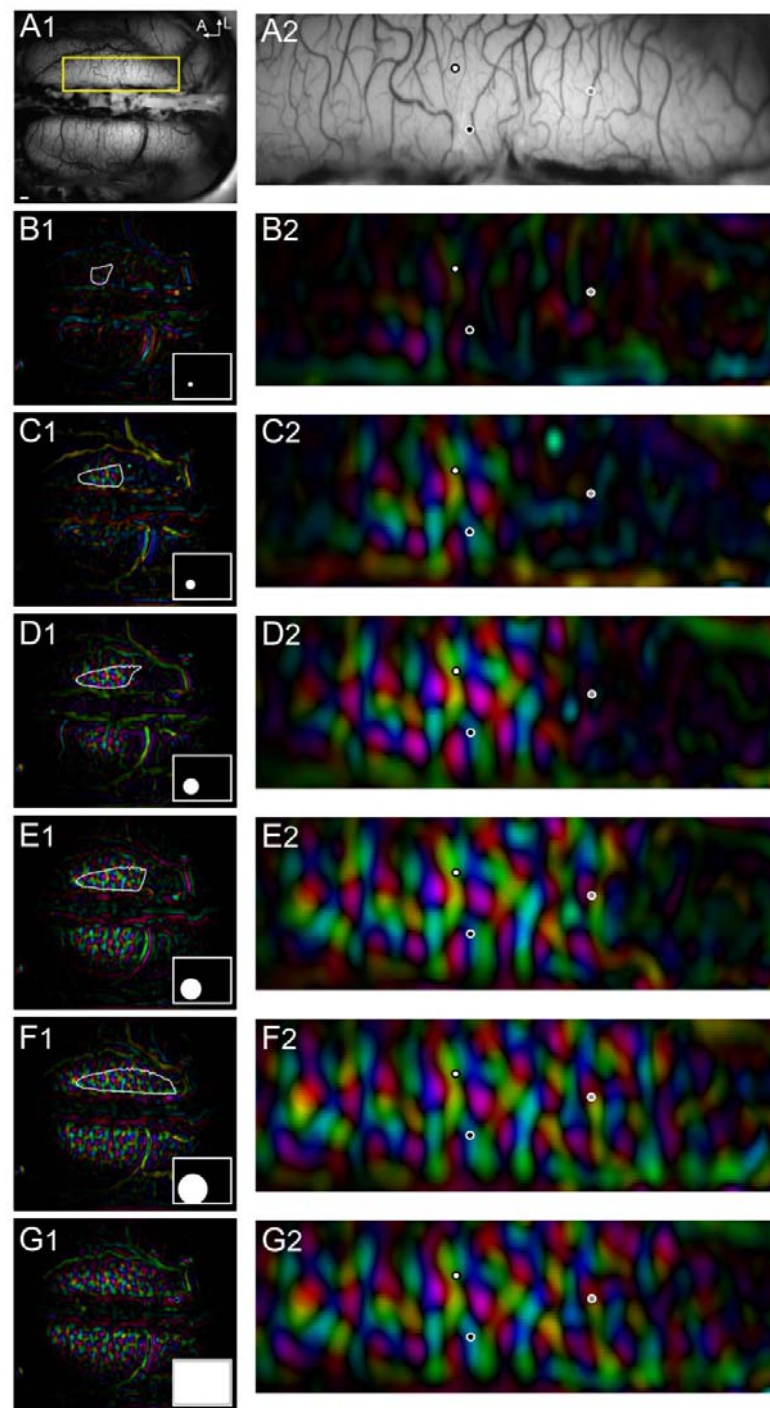


Figure 2. Spread of activation as a function of the diameter.

(A) Vasculature pattern in the region of interest of the visual cortex. Panel A2 shows a magnified view of the yellow box in panel A1. (B-G) Orientation maps evoked by different stimulus diameters (gratings: 4Hz, 0.15cpd, circle of 6, 12, 18, 24, 40 deg and full screen). Stimuli were placed at: elevation, -22 deg and azimuth, -6deg. Colors refer to preferred orientations and brightness designates signal magnitude. White outlines indicate the spread for each stimulus diameter (see methods) and black, gray and white dots are the location

of the measures shown in figure 3. Scale bar = 1 mm.

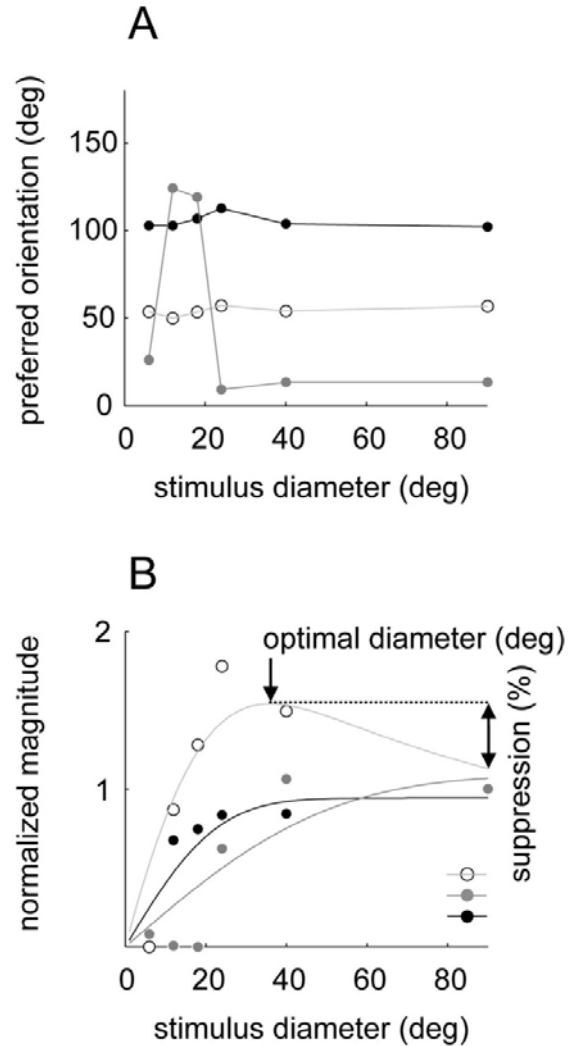


Figure 3. Response to varying stimulus diameters.

(A) Preferred orientation as a function of the stimulus diameter in three locations indicated in figure 2 (black, gray and white dots). (B) Magnitude normalized (dots) in these same locations. Lines are fits of magnitudes by the function described in the Methods section. The optimal diameter and suppression at the level of the white dot were 36 deg and 20% respectively. The optimal diameter at the position of the black dot was the “full field” without any suppression (0%).

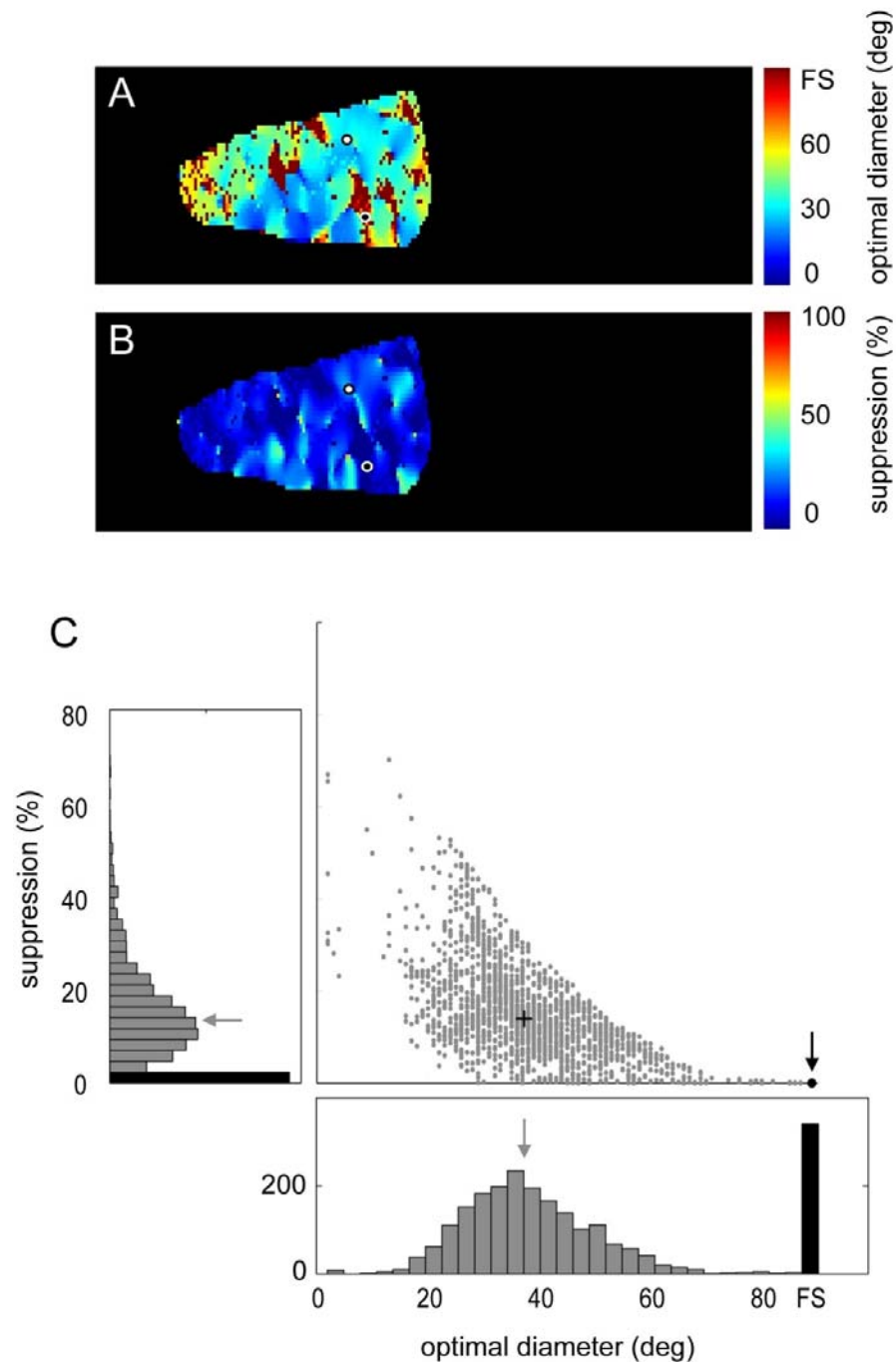


Figure 4. Optimal diameters and suppressions maps.

(A) Optimal diameters map in the same ROI shown in figure 2, panels 2. Black and white dots are the location where measures shown in figure 3 were taken. (B) Suppressions map. (C) Scatter plot and histograms of the distribution of optimal diameters and suppressions in the “point spread”. Black arrows and cross indicate means. Gray bars in histograms and dots in scatter plot correspond to pixel with suppression by the full field. Black bars and black dot correspond to pixel without suppression. FS: full screen.

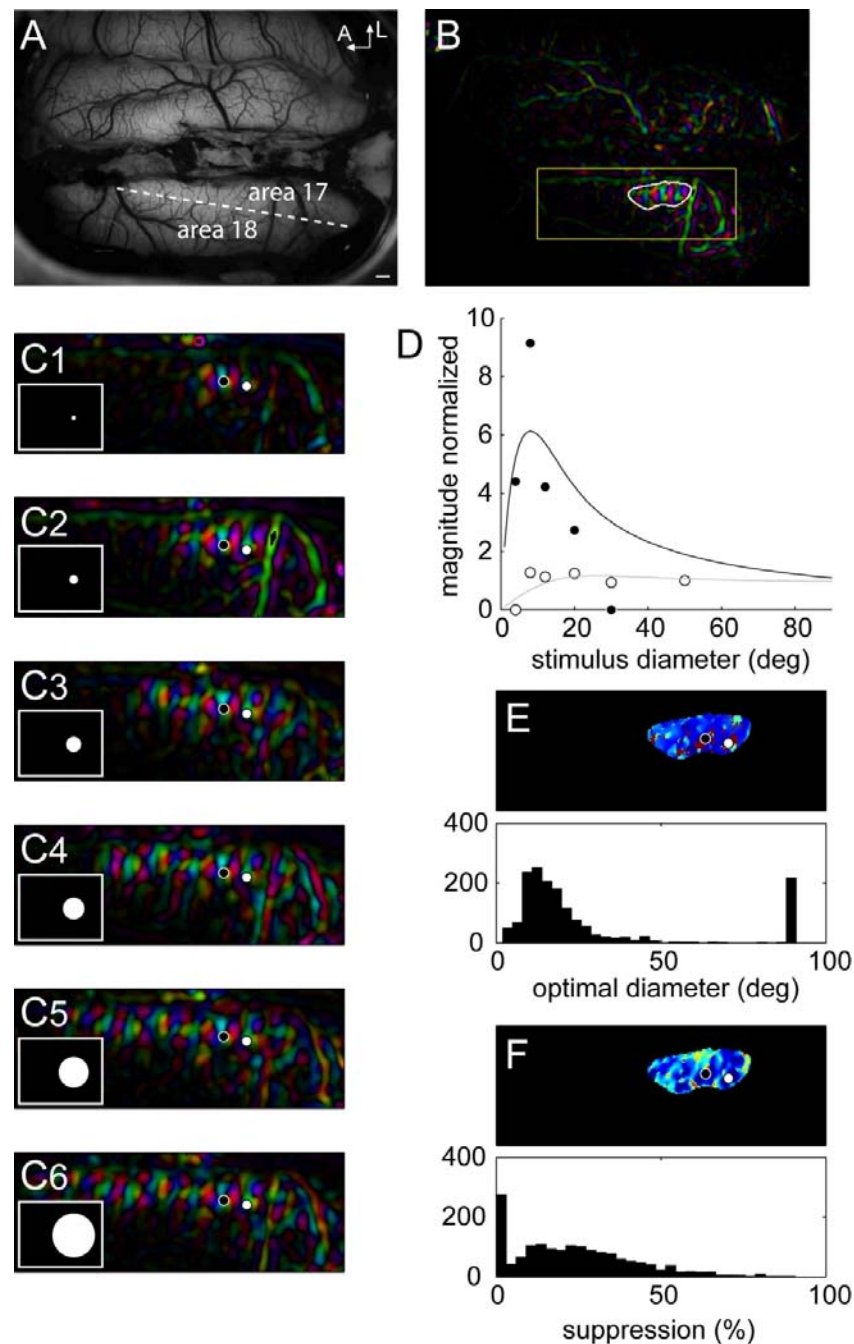


Figure 5. Responses in area 17 to increasing stimulus sizes.

(A) Vasculature pattern in the region of interest of the visual cortex. Dotted line indicates the border between areas 17 and 18. (B) Orientation maps evoked by a grating (2Hz, 0.5cpd) in a 8 deg diameter window centered at -5 deg of elevation and +10deg along the azimuth. White outlines indicate the "point spread" of activation. (C) Magnified orientation maps within the region indicated by a yellow box in panel B for six stimulus diameters (4, 8, 12, 20, 30 and 50 deg). (D) Magnitude normalized (dots) and fit (lines) in the two locations indicated in panel C (black and white dots). (E) Optimal diameters map and histogram of the distribution. (F) Suppressions map and histogram of the distribution. Scale bar = 1mm.

For the 36 experiments involving four orientations, optimal diameters consisted on a full field stimulation (without any suppression) in 17.1 ± 5.9 % (n = 8) of pixels in area 17 and 26.6 ± 10.0 % (n=28) in area 18. These values are significantly different (p=0.016). For others pixels with suppression, optimal diameters were significantly smaller in area 17 than in 18 (area17: 22.4 ± 6.1 deg (n=8), area 18: 36.1 ± 8.5 deg (n=28), p = 0.0002). By contrast, no differences were observed in suppression values (area 17: 25.1 ± 3.0 % (n=8), area 18: 21.4 ± 8.1 % (n=28), p = 0.207). The same values were observed for experiments in which two orientations were added to the quantifications: optimal diameters were 21.8 ± 6.0 deg (n=9) in area17 and 34.9 ± 8.9 deg (n=31) in area 18, p = 0.0002 and suppression was 26.8 ± 5.7 % (n=9) in area 17 and 22.5 ± 9.0 % (n=31) in area 18: p = 0.190. The common value attributed to the full screen was 90 deg to compute the fit and optimal diameters and suppressions estimations. We verified the influence of this value on the above computation by replacing 90 by 180 deg. This operation only increased by 20% both optimal diameters and suppressions estimations (paired t test: p < 0.001, n=16).

It has been shown that RF size increased with eccentricity (Tusa et al., 1978; Tusa et al., 1979). We therefore measured optimal diameters as a function of the eccentricity of stimulation to determine whether this observation can be confirmed with optical signals. The relation between optimal diameters and eccentricity is presented in panel A of Figure 6. There was a small tendency for optimal values to increase with elevation supporting the known relationship between RF size and eccentricity in mammals with foveal representation. However, this tendency does not reach statistical significance (area 17: r=0.43 (p=0.248), area 18: r=0.3 (p=0.105), area 17+18: r=0.5 (p=0.001)). Again, a weak, but opposite, tendency was observed between suppression and eccentricity (Panel B, area 17: r=-0.51 (p=0.165), area 18: r=-0.29 (p=0.12), area 17+18: r=-0.37 (p=0.02)). Finally, the relationship between optimal diameters and suppression values is presented in panel C. There is a clear negative correlation between the two such that larger optimal

diameters are associated with lesser suppression (area 17: $r=-0.72$ ($p=0.03$), area 18: $r=-0.86$ ($p=0$), area 17+18: $r=-0.8$ ($p=0$)).

Relationship between optimal diameters and suppressions maps with the orientation map

We investigated the possible interaction between surround suppression and orientation throughout the surface of the cortex (Figure 7). Orientation maps are organized in periodic domains of iso-orientations and singularities (i.e. pinwheels, see white circle in panel A). Relationships between surround and orientation maps can follow different patterns, illustrated in panels A. The uniformity of coverage is an organization where each parameter (e.g. low or high surround suppression domains), corresponds to an equal proportion of orientations and other parameters for each position in the visual space. In this situation, pinwheels should be uniformly distributed in the center of each surround domains (panel A1, (Swindale, 2001; Swindale, 1998, 2000)). Another possibility can also be that one parameter is more represented in the location of pinwheels (panel A2 and A3). Finally, we can also include the possibility that orientation singularities are present only in transitions between two parameters (panel A4, high and low surround suppression). In all these situations, an orientation-inherited periodicity is expected in the optimal diameters or suppressions maps if there is a relationship with orientation maps.

Panel B displays a portion of the cortical surface of area 18 of animal case #4, and the associated optimal diameters map is shown in panel C. The 2D auto-correlogram of this map is presented in panel D and shows the presence of periodic domains of $\sim 800\mu\text{m}$. This periodic organization was observed in the majority of cases. Panel E shows the orientation map on which the optimal diameters map (bright and dark regions) was superimposed. White circles indicate the position of “pinwheels”, which are mostly present at the border of bright and dark regions (i.e. domains of optimal diameters map). The border of domains of optimal diameters and singularities in orientation map was calculated with the 2D-gradient and is presented in panel F. As previously observed, high orientation gradients (in yellow) were partially superimposed to high optimal diameters gradient regions (in blue).

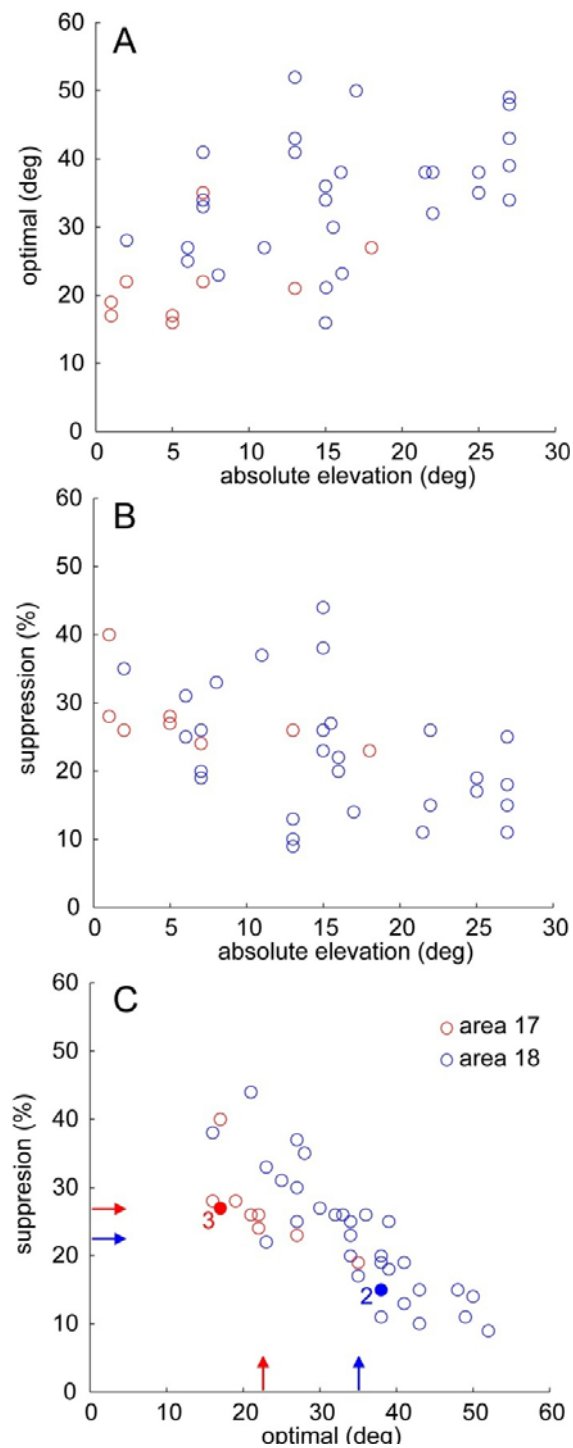


Figure 6. Optimal diameters and suppressions values

(A) Scatter plot between optimal diameters values and absolute elevation in areas 17 (red circles) and 18 (blue circles). (B) Scatter plot between suppression values and absolute elevation. (C) Scatter plot between optimal diameters and suppression values. Filled circles represents data from the experiment displayed in figure 2-4 (blue filled circle, case #2) and figure 5 (red filled circle, case #3). Arrows indicate mean values of optimal diameters and suppressions in areas 17 and 18.

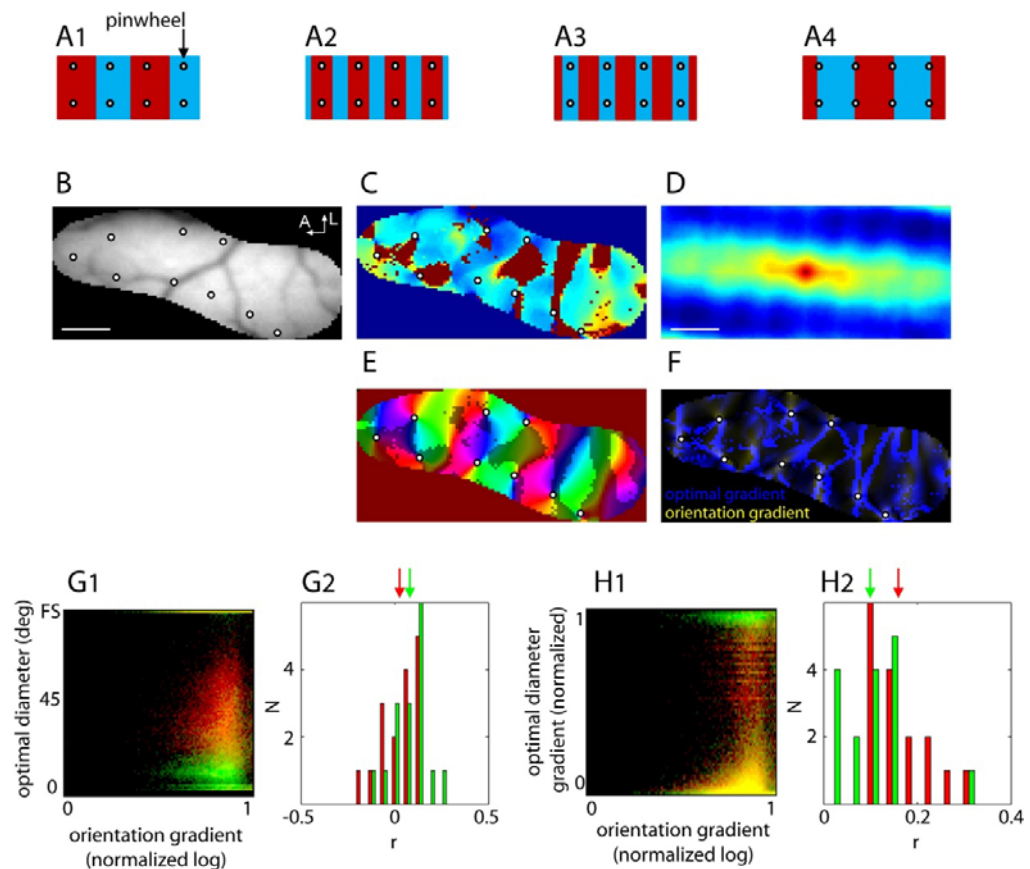


Figure 7. Relationship between optimal diameters and suppressions map with orientation map.

(A) Different patterns of organization between orientation and optimal diameter / suppression maps are proposed. Blue and red bars represent high and low suppression domains respectively. White circles are the location of pinwheels in the orientation map. (B) Vasculature pattern in the region of interest of the visual cortex. (C) Optimal diameter maps. (D) 2D-autocorrelogram of the optimal diameter maps (See (McLoughlin and Schiessl, 2006; Villeneuve et al., 2009) for the method). (E) Orientation maps evoked by a grating (4Hz, 0.15 cpd) in a circle of 12 deg. Bright and dark regions are the superimposed locations of high and low suppression domains, respectively. (F) 2D orientation gradient (in yellow) superimposed on optimal diameter gradient (in blue). (G1) Distribution of pixels as a function of orientation gradient and optimal stimulus diameter in 16 independent experiments (in red) and in a shuffle situation (in green) in area 18. These 16 independent experiments out of 31 were chosen for correlation because the same sequence of diameter and 4 orientations were used to calculate the optimal diameter and suppression values. The majority of the orientation layout is constituted by domains where orientation gradient is close to zero and the number of pixels with high value (i.e. pinwheel) is extremely limited. So, logarithm of gradient was used to extend the distribution. (G2) Distribution of correlation values in these same 16 independent experiments. Arrows indicate mean values. (H1) Distribution of pixels as a function of orientation and optimal diameter gradients. (H2) Distribution of correlation values. Scale bar = 1mm.

Correlation coefficients between 2D-orientation gradient maps and optimal stimulus diameter or suppression maps in area 18 were calculated and compared with a shuffle situation to reveal statistical inference (see Methods). No correlation was observed with optimal stimulus diameter (correlation: $r = 0.02 \pm 0.10$, shuffle: $r = 0.08 \pm 0.10$, $p=0.125$ ($n=16$)) or suppression (correlation: $r = 0.05 \pm 0.13$, shuffle: $r = 0.00 \pm 0.11$, $p=0.200$ ($n=16$)). Panel G1 displays the distribution of pixels as a function of orientation gradient and optimal stimulus diameter in 16 independent experiments (in red) and in a shuffle situation (in green). Panel G2 displays the distribution of correlation values in these same 16 independent experiments. The absence of positive or negative correlation goes against the hypothesis of the patterns of organisation proposed in panels A2 and A3.

Correlation coefficients between 2D-orientation gradients and 2D optimal stimulus diameter or 2D suppression gradients were also calculated. A significant positive correlation was observed with 2D optimal diameter gradients (correlation: $r = 0.16 \pm 0.07$, shuffle: $r = 0.10 \pm 0.08$, $p=0.018$ ($n=16$)) but not with 2D suppression gradients (correlation: $r = 0.21 \pm 0.07$, shuffle: $r = 0.18 \pm 0.11$, $p=0.346$ ($n=16$)). Panel H1 displays the pixel distribution as a function of orientation gradients and optimal stimulus diameter gradients and panel G2 displays the distribution of correlation values showing the weak existing correlation. The absence of negative correlation goes against the hypothesis of uniformity of coverage (panel A1). In conclusion, if any organisation exists, it is weak and more likely to follow the model displayed in panel A4.

Control of the neuronal origin of optimal diameters and suppressions maps

One may raise the possibility that surround maps originates mainly from cerebral fluctuations and not from neuronal responses. This cannot be the case. Unlike responses from neuronal origin, fluctuations will vary across repetitions. Therefore, if an experiment is divided into two sub-experiments, the two sub-maps should be identical if they are built from neuronal signals. This is demonstrated in figure 8 from the animal case #4. Panel A displays an average of 20 optimal diameters maps constructed from half of the trials

randomly chosen at each iteration (see Methods). The two maps are identical. In contrast, no maps can be seen in the shuffle situation (panel B, see Methods). Panel C displays the distribution of optimal diameter for every pixel of the map for the 20 iterations in normal (red) and shuffle (green) condition and panel D presents the distribution of correlation values in these 20 iterations. A strong correlation was observed between optimal diameter maps (normal maps: 0.34 ± 0.08 , shuffle maps: 0.00 ± 0.12 , $p < 0.001$) but also between suppression maps (not shown, normal maps: 0.35 ± 0.13 , shuffle maps: 0.04 ± 0.20 , $p < 0.001$).

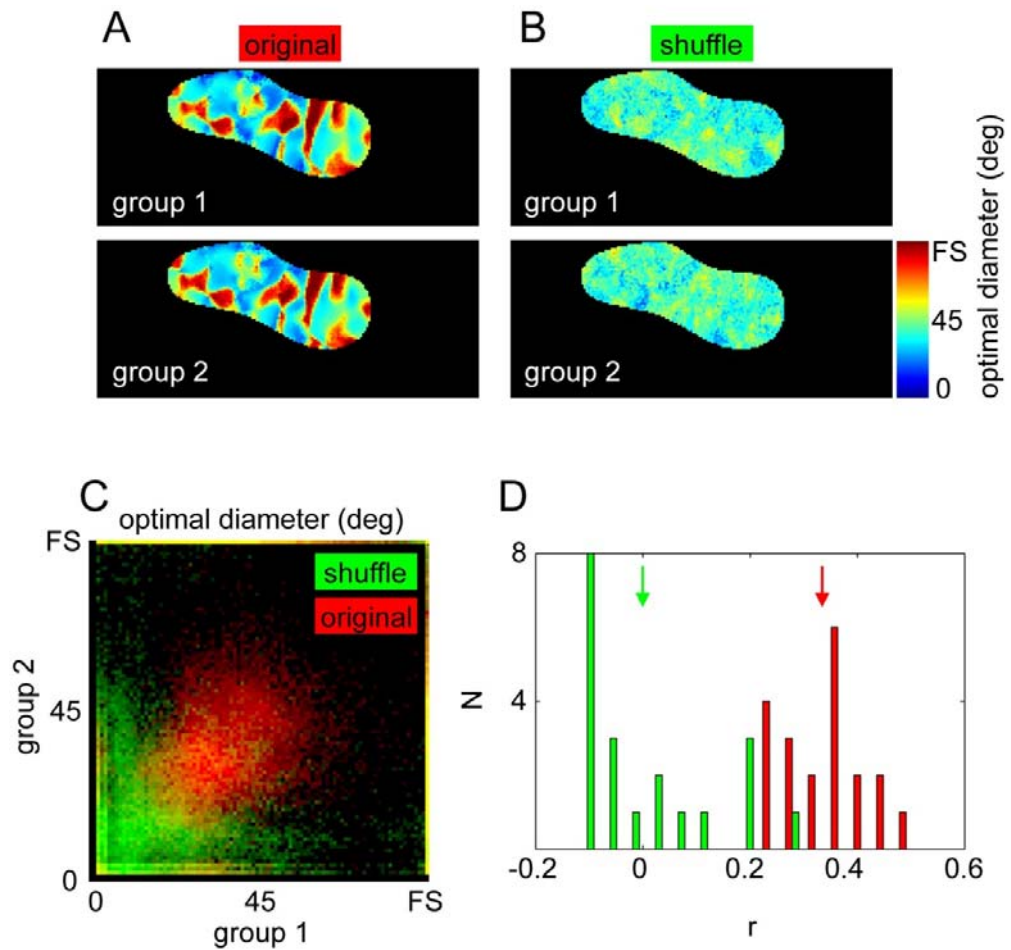


Figure 8. Neuronal origin of optimal diameters or suppressions maps

(A-B) Average of 20 optimal diameters maps construct from half of trials randomly chosen at each iteration in normal and shuffle situations, respectively. 20 trials (~ 5 hours) were used to build each optimal diameters map. (C) Distribution of optimal diameters in every pixels of the map for the 20 iterations in normal (red) and shuffle (green) conditions. (D) Distribution of correlation values in these 20 iterations in normal (red) and shuffle (green) conditions. Arrows indicate mean values.

DISCUSSION

Our results indicate that surround modulation in the cat visual cortex can be trustfully quantified by optical imaging and appears to be organized in low and high suppression domains. Orientation maps in restricted cortex region of some millimeters (i.e. “point spread”) could be revealed by presenting drifting gratings in circumscribed zones of the visual field. Increasing the size of stimulation by increasing the stimulus diameter augmented the spread of cortical activation. The amplitudes of the orientation response were measured in each pixel of the “point spread” to determine optimal diameter and suppression. In three quarter of the pixels, typical surround suppression profiles were observed, while in the remaining ones, no suppression was observed. Optimal diameters were smaller in area 17 than in area 18, in accordance with electrophysiological data on receptive field size of neurons in these two areas. We also report a weak relationship between optimal diameter and eccentricity. No difference in the suppression strength was observed between both areas (~25%). In some cases, pixels with high suppression were organized in periodic domains with a size comparable to that of orientation domains. Finally, we could not find a definite relationship between surround and orientation maps, with the exception that pinwheels were more likely to be present in transition zones between high and low surround domains.

Functional involvement of the surround maps

The organisation of neurons in functional modules involved in the analysis of a given parameter of the visual image is considered to be a strategy to optimize processing. A number of modular maps have been previously revealed by optical imaging of intrinsic signals, such as orientation (Grinvald et al., 1986), direction of motion (Malonek et al., 1994; Shmuel and Grinvald, 1996; Vanni et al., 2010), ocular dominance (Frostig et al., 1990), ocular disparity (Chen et al., 2008), spatial frequency (Issa et al., 2000), color (Lu and Roe, 2008) or optic flow (Raffi and Siegel, 2007). Modules originate principally from the organization of feed-forward connections during development. However, surround maps revealed here in the primary visual

cortex could originate from a spatial arrangement of feedbacks from higher level structures involved in center surround interaction.

Validity of surround maps

Nevertheless, there are sometimes controversies about the existence maps (e.g. spatial frequency: (Sirovich and Uglesich, 2004)) because of the possible contribution of blood vessels and cerebral fluctuations. In the present study, large blood vessel locations have not been analysed. Moreover, we developed a strategy using shuffle computation to confirm that surround maps came from a neuronal origin and not from cerebral and blood fluctuations. This strategy involved however splitting experiments into two sub-experiments, reducing then the signal to noise ratio. In the majority of cases, the signal to noise ratio obtain with every repetitions was strong enough to reveal a map but the experiment could not be split without removing the map reliability. However, in parts of the experiments (such as the one presented in figure 8), the high signal to noise ratio was strong enough to allow splitting the data in two sub-experiments and successfully confirm the validity and reliability of surround maps.

Spatial interaction with other cortical maps

A classical interaction between maps follows the principle of “uniformity of coverage”. In this situation, each parameter is arranged so that in each portion of the visual field, each of these parameters is uniformly represented (Swindale, 2001; Swindale, 1998, 2000). However, our results suggested that this is not the situation existing between surround and orientation maps. Another interaction can be that surround domains are frequently observed in the location of pinwheels. For example, because of the heterogeneity of orientation inputs in pinwheels, the center-surround interaction could be more represented in these locations. Moreover, jumps in RF positions were frequently found in these locations (Das and Gilbert, 1997). Then the heterogenic environment of the input (i.e. positions and orientations) in these locations may be at the origin of higher suppression in discontinuities

(Das and Gilbert, 1999). However, the analysis of interaction between orientation and surround maps from our results would suggest that such interaction is not encountered. Conversely, it appears that pinwheels were slightly more located at the border between domains of high and low surround modulation. In all cases presented above, because of the spatial interaction, the periodicity of orientation maps should be transmitted to surround maps. This has indeed been the case since in a number of experiments; high and low suppression modules of sizes similar to orientation modules have been identified.

Due to the fact that recordings were performed after monocular stimulations, it is possible that surround maps came in part from ocular dominance maps in area 17 (Kim et al., 1999; Shatz and Stryker, 1978). This is unlikely since surround maps are found in area 18 where ocular dominance maps are absent. Further investigations should be conducted to study the interaction between surround maps and other maps such as ocular dominance, spatial frequency or direction maps (Issa et al., 2000; Shmuel and Grinvald, 1996).

Comparison with primates

One question remains: Can the surround maps found in the primary visual cortex of the cat be present in the primary visual cortex of primates? Or is it an evolutionary strategy to optimize object/background segregation in hunting mammals (such as carnivores)? In a certain way, it resembles the situation prevailing for motion: modules for motion are present in area MT of primates (Malonek et al., 1994) but not in area V1 while they are present early in the primary visual cortex of carnivores (e.g. area 18 of cats: (Shmuel and Grinvald, 1996)). Conversely, as in the case for direction modules in cats, a question remains about the existence of modules (direction and / or surround sound) in the homologue of area MT in the cat (i.e. the PMLS, (von Grunau and Frost, 1983)).

Surround parameters estimation

Two concerns must be discussed about the appropriateness of the surround parameters calculated in this study: Firstly, estimation of the optimal diameter and suppression directly from the limited number of points for the profile (typically: six) does not offer a strong resolution and is very sensitive to noise (not shown). This is the reason why we chose to fit the distribution by a “ratio of function” model to evaluate optimal diameter and suppression (Cavanaugh et al., 2002a; Sceniak et al., 2001; Tailby et al., 2007). This can obviously introduce a misevaluation of surround parameters. However, the fit calculated with other models, such as “difference of function”, do not strongly affect the measures (essentially the suppression strength, not shown) and so does not weaken the main conclusions which are the (1) the suppression profile can be investigated by optical imaging; (2) the optimal diameter measured by optical imaging is related to the population of RF size and (3) the surround modulation appears to be organized in a cortical map.

Secondly, using a flat screen not covering the whole field of view could introduce some inaccuracies. Indeed, in our visual stimulation setup, as the stimulus diameter increased, the real diameter perceived by the subject was less than it should normally be and the spatial frequency was higher. The surround receptive field was then stimulated on a smaller area and with a non-optimal spatial frequency that could reduce the suppression effects (DeAngelis et al., 1994). Besides, because the diameters were smaller than they should be, the optimal diameters calculated were likely overestimated. The “diameter value” attributed to the “full screen” can also introduce some uncertainties. Fits were calculated with a value of 90 deg corresponding to the maximum complete circle on the screen. Nevertheless, to control the influence of this value, fits were also calculated with a value of 180 deg corresponding to a complete hemi-field of view. This did not affect the measures (error = 20%). Similarly, in some experiments in area 17, full screen was not presented (e.g. see figure 5). This was sometimes done to obtain a better estimation of optimal stimulus diameters without increasing the number of diameters presented and, consequently, the duration of recordings. However, the maximum value (i.e. 50 deg in this example) was more than three times greater than the optimal

diameter (i.e. mean A17 = 17deg, 8 deg in this example). This maximum value / optimal diameter ratio was comparable to the situation in area 18 (i.e. “full screen”, 90 deg is ~3x greater than 35 deg, the optimal diameter average). In conclusion, if this choice introduced a misvaluation in area 17 evaluations, it probably did not affect more the quantifications than for area 18.

Anatomic and functional origin of the signal

The optimal diameter values were larger than the RF sizes of underlying neurons (Tusa et al., 1978; Tusa et al., 1979). This is probably due to the following reasons: (1) As described in (Dumoulin and Wandell, 2008) and (Vanni et al., submitted), one pixel in optical imaging represents the activity of several neurons (i.e. their RF positions are scattered) and intrinsic optical signals consist of spiking and sub-threshold activity, post-synaptic and pre-synaptic signals from lateral, feedbacks and feed-forward LGN connections. (2) Moreover, as described in the previous section, the use of a flat screen for visual stimulation had probably caused an over-estimation of optimal diameters. The superficial layer origin of the response in optical imaging was unlikely a source of inaccuracy because every previous studies always found suppression in these layers (Akasaki et al., 2002; DeAngelis et al., 1994; Gilbert, 1977; Walker et al., 2000). In contrast, suppression values were consistent with those found by (Akasaki et al., 2002) (56% of neurons in area 17 had a suppression of 44% in electrophysiology (= average in cortex ~25%), present study: mean = ~25%).

Point spread delimitation

Despite the use of the largest recording chamber used to date in optical imaging (Villeneuve et al., 2009), the delimitation and quantification of borders of the “point spread” have not been always easy. In many cases, the “point spread” was partially covered by the dura and skull or hidden in sulci (see figure 1). Nevertheless (and despite the use of bigger stimuli), the sizes of the “point spread” was comparable to those revealed in previous works using intrinsic signal methods (Toth et al., 1996: 6 mm, Das and Gilbert, 1995: 4 mm). In the present study, the size decreased with eccentricity unlike the

results presented by (Das and Gilbert, 1995). One explanation may be that the range of eccentricities tested in the present study was broader (elevation: 0 – 27 deg). Even with a large sized recording chamber, we could not easily access area 17 located in the posterior part of the craniotomies in adult cats. This reduced the number of experiments in area 17 and introduced a possible inaccuracy: responses in area 17 (and area 18 for low eccentricities) came principally from the transition zone between areas 17 and 18 where neuronal properties are “hybrid” (Vanni et al., 2010). This may explain why a statistical inference was found in the correlation between optimal diameter and eccentricity only when areas 17 and 18 data was pooled.

In conclusion, our data present strong evidence of the existence of surround modules in the primary visual cortex of cat. This spatial arrangement at low level may be a strategy to optimize objet ground segregation in hunting animals such as carnivores.

REFERENCES

- Akasaki, T., Sato, H., Yoshimura, Y., Ozeki, H., Shimegi, S., 2002. Suppressive effects of receptive field surround on neuronal activity in the cat primary visual cortex. *Neurosci Res* 43, 207-220.
- Allman, J., Miezin, F., McGuinness, E., 1985. Direction- and velocity-specific responses from beyond the classical receptive field in the middle temporal visual area (MT). *Perception* 14, 105-126.
- Angelucci, A., Levitt, J.B., Walton, E.J., Hupe, J.M., Bullier, J., Lund, J.S., 2002. Circuits for local and global signal integration in primary visual cortex. *J Neurosci* 22, 8633-8646.
- Bishop, P.O., Kozak, W., Vakkur, G.J., 1962. Some quantitative aspects of the cat's eye: axis and plane of reference, visual field co-ordinates and optics. *J Physiol* 163, 466-502.
- Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1996. Optical imaging based on intrinsic signal—the methodology. In A. W. Toga and J. C. Mazziotta (Eds) *Brain Mapping: The Methods*.
- Born, R.T., 2000. Center-surround interactions in the middle temporal visual area of the owl monkey. *J Neurophysiol* 84, 2658-2669.
- Born, R.T., Tootell, R.B., 1992. Segregation of global and local motion processing in primate middle temporal visual area. *Nature* 357, 497-499.
- Bosking, W.H., Kretz, R., Pucak, M.L., Fitzpatrick, D., 2000. Functional specificity of callosal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci* 20, 2346-2359.
- Cavanaugh, J.R., Bair, W., Movshon, J.A., 2002a. Nature and interaction of signals from the receptive field center and surround in macaque V1 neurons. *J Neurophysiol* 88, 2530-2546.
- Cavanaugh, J.R., Bair, W., Movshon, J.A., 2002b. Selectivity and spatial distribution of signals from the receptive field surround in macaque V1 neurons. *J Neurophysiol* 88, 2547-2556.
- Chen, G., Lu, H.D., Roe, A.W., 2008. A map for horizontal disparity in monkey V2. *Neuron* 58, 442-450.
- Das, A., Gilbert, C.D., 1995. Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature* 375, 780-784.
- Das, A., Gilbert, C.D., 1997. Distortions of visuotopic map match orientation singularities in primary visual cortex. *Nature* 387, 594-598.
- Das, A., Gilbert, C.D., 1999. Topography of contextual modulations mediated by short-range interactions in primary visual cortex. *Nature* 399, 655-661.

- DeAngelis, G.C., Freeman, R.D., Ohzawa, I., 1994. Length and width tuning of neurons in the cat's primary visual cortex. *J Neurophysiol* 71, 347-374.
- Dumoulin, S.O., Wandell, B.A., 2008. Population receptive field estimates in human visual cortex. *Neuroimage* 39, 647-660.
- Durand, S., Freeman, T.C., Carandini, M., 2007. Temporal properties of surround suppression in cat primary visual cortex. *Vis Neurosci* 24, 679-690.
- Fitzpatrick, D., 2000. Seeing beyond the receptive field in primary visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 10, 438-443.
- Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., Grinvald, A., 1990. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6082-6086.
- Gilbert, C.D., 1977. Laminar differences in receptive field properties of cells in cat primary visual cortex. *J Physiol* 268, 391-421.
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., Wiesel, T.N., 1986. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324, 361-364.
- Issa, N.P., Trepel, C., Stryker, M.P., 2000. Spatial frequency maps in cat visual cortex. *J Neurosci* 20, 8504-8514.
- Kim, D.S., Matsuda, Y., Ohki, K., Ajima, A., Tanaka, S., 1999. Geometrical and topological relationships between multiple functional maps in cat primary visual cortex. *Neuroreport* 10, 2515-2522.
- Levitt, J.B., Lund, J.S., 1997. Contrast dependence of contextual effects in primate visual cortex. *Nature* 387, 73-76.
- Lu, H.D., Roe, A.W., 2008. Functional organization of color domains in V1 and V2 of macaque monkey revealed by optical imaging. *Cereb Cortex* 18, 516-533.
- Malonek, D., Tootell, R.B., Grinvald, A., 1994. Optical imaging reveals the functional architecture of neurons processing shape and motion in owl monkey area MT. *Proc Biol Sci* 258, 109-119.
- McLoughlin, N., Schiessl, I., 2006. Orientation selectivity in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): the periodicity of orientation columns in V1 and V2. *Neuroimage* 31, 76-85.
- Naito, T., Sadakane, O., Okamoto, M., Sato, H., 2007. Orientation tuning of surround suppression in lateral geniculate nucleus and primary visual cortex of cat. *Neuroscience* 149, 962-975.
- Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T., Naito, T., Shimegi, S., Sato, H., 2004. Relationship between excitation and inhibition underlying size tuning and

- contextual response modulation in the cat primary visual cortex. *J Neurosci* 24, 1428-1438.
- Polat, U., Mizobe, K., Pettet, M.W., Kasamatsu, T., Norcia, A.M., 1998. Collinear stimuli regulate visual responses depending on cell's contrast threshold. *Nature* 391, 580-584.
- Raffi, M., Siegel, R.M., 2007. A functional architecture of optic flow in the inferior parietal lobule of the behaving monkey. *PLoS One* 2, e200.
- Sceniak, M.P., Hawken, M.J., Shapley, R., 2001. Visual spatial characterization of macaque V1 neurons. *J Neurophysiol* 85, 1873-1887.
- Sengpiel, F., Sen, A., Blakemore, C., 1997. Characteristics of surround inhibition in cat area 17. *Exp Brain Res* 116, 216-228.
- Shatz, C.J., Stryker, M.P., 1978. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* 281, 267-283.
- Shmuel, A., Grinvald, A., 1996. Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *J Neurosci* 16, 6945-6964.
- Shmuel, A., Grinvald, A., 2000. Coexistence of linear zones and pinwheels within orientation maps in cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5568-5573.
- Sirovich, L., Uglesich, R., 2004. The organization of orientation and spatial frequency in primary visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16941-16946.
- Swindale, N., 2001. Cortical cartography: what's in a map? *Curr Biol* 11, R764-767.
- Swindale, N.V., 1998. Cortical organization: modules, polymaps and mosaics. *Curr Biol* 8, R270-273.
- Swindale, N.V., 2000. How many maps are there in visual cortex? *Cereb Cortex* 10, 633-643.
- Tailby, C., Solomon, S.G., Peirce, J.W., Metha, A.B., 2007. Two expressions of "surround suppression" in V1 that arise independent of cortical mechanisms of suppression. *Vis Neurosci* 24, 99-109.
- Toth, L.J., Rao, S.C., Kim, D.S., Somers, D., Sur, M., 1996. Subthreshold facilitation and suppression in primary visual cortex revealed by intrinsic signal imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9869-9874.
- Tusa, R.J., Palmer, L.A., Rosenquist, A.C., 1978. The retinotopic organization of area 17 (striate cortex) in the cat. *J Comp Neurol* 177, 213-235.
- Tusa, R.J., Rosenquist, A.C., Palmer, L.A., 1979. Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol* 185, 657-678.

- Vanni, M.P., Casanova, C., 2006. Influence of stimulus size on the pattern and amplitude of orientation maps in the cat primary visual cortex revealed by optical imaging. SfN abstract prog. 545.8.
- Vanni, M.P., Provost, J., Casanova, C., Lesage, F., 2010. Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage* 49, 1416-1431.
- Vanni, M.P., Provost, J., Lesage, F., Casanova, C., submitted. Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *J Neurosci Methods*.
- Villeneuve, M.Y., Vanni, M.P., Casanova, C., 2009. Modular organization in area 21a of the cat revealed by optical imaging: comparison with the primary visual cortex. *Neuroscience*.
- von Grunau, M., Frost, B.J., 1983. Double-opponent-process mechanism underlying RF-structure of directionally specific cells of cat lateral suprasylvian visual area. *Exp Brain Res* 49, 84-92.
- Walker, G.A., Ohzawa, I., Freeman, R.D., 2000. Suppression outside the classical cortical receptive field. *Vis Neurosci* 17, 369-379.
- Wieland, J., Sajda, P., 2006. Extraclassical receptive field phenomena and short-range connectivity in V1. *Cereb Cortex* 16, 1531-1545.

ARTICLE 2

Publié dans Neuroscience. 2009 Dec 15;164(3):1320-33.

**Modular Organization in Area 21a of the Cat Revealed by Optical Imaging:
Comparison with the Primary Visual Cortex**

M.Y. Villeneuve^{1,2,*}, M.P. Vanni^{1,3}, and C. Casanova¹

¹ Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie,

² Département de Physiologie, Faculté de Médecine,

³ Département de Sciences biomédicales, Faculté de Médecine
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Christian Casanova
Laboratoire des Neurosciences de la Vision
École d'optométrie
Université de Montréal
CP 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7
Tel. (514) 343-2407
Fax. (514) 343-2382

Web: <http://www.opto.umontreal.ca/neurosciences/>

Running title: **Functional Organization of Area 21a**

* Present address: NMR Martinos Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129.

ACKNOWLEDGMENTS.

This work was supported by NSERC and CIHR grants to C.C. FRSQ provided part of C.C.'s salary (*Chercheur National* program). MYV was supported in part by a CIHR-Baker Foundation fellowship. MPV was supported in part by a fellowship from the Ministry of Foreign Affairs (Government of Canada). We thank Hongbo Yu and Brandon Farley of Mriganka Sur's lab (MIT) for their help in learning optical imaging signal analysis. We also thank Nathalie Rochefort, Zoltán F. Kysvárdy and Péter Buzás while in Ulf Eysel's lab for the technical training of MYV, and Klaus-Peter Hoffmann and Dirk Jancke for their supervision of MYV during his stay in Bochum, Germany. We also thank Curtis Baker for his comments on a draft of the manuscript.

ABSTRACT

Area 21a, located on the cat's lateral suprasylvian cortex, is considered as a higher-order cortical area. Little is known about its exact role in visual processing. In this study, the functional organization of area 21a was investigated by optical imaging of intrinsic signals and was compared to that of primary visual areas. We found a clear modular pattern for orientation selectivity in area 21a, with signal amplitude being four times lower than that in primary visual areas. There were no significant differences between the domains' characteristics, nor the tuning bandwidth, in areas of the primary visual cortex (17 and 18) and 21a. This suggests that the basic cortical structure is independent of the hierarchical level or function of one area. A uniform representation of spatial frequency was found in areas 17 and 18, as well as in area 21a. The mean preferred spatial frequency in area 21a was 0.30 c/deg. In contrast to area 18, no direction maps were observed in area 21a whether drifting gratings or random dot kinematograms were used. This study supports the proposal that area 21a plays a pivotal role along the ventral processing stream and is mainly involved in form processing.

Keywords: Direction selectivity, Orientation selectivity, Spatial frequency, Extra-striate cortex, Ventral pathway

INTRODUCTION

Area 21a represents a higher order cortical area located on the cat's lateral suprasylvian (LS) cortex (Scannell et al., 1995; Hilgetag et al., 2000; Grant and Hilgetag, 2005). It receives its principal cortical input not only from area 17, but also from areas 18 and 19 (Symonds and Rosenquist, 1984a, b; Shipp and Grant, 1991; Conway et al., 2000; Stewart et al., 2000; Grant and Hilgetag, 2005). It is also connected to the thalamus and the superior colliculus (Hashemi-Nezhad et al., 2003) via the lateral division of the lateral-posterior nucleus (LPI; Symonds et al., 1981; Raczkowski and Rosenquist, 1983, Shipp and Grant, 1991).

The overall functional properties of area 21a cells suggest that this area plays a role in the analysis of visual information based on form and therefore holds a key position in the ventral processing stream (form, learning and recognition; Lomber et al., 1996, 2001). Cells in area 21a have complex-like receptive field structure and are strongly sensitive to the stimulus orientation (Mizobe et al., 1988; Winborne and Henry, 1992; Dreher et al., 1993; Toyama et al., 1994; Dreher et al., 1996; Tardif et al., 1996; Wang and Dreher, 1996; Morley and Vickery 1997). It does not receive a significant excitatory input from the Y-channel (Dreher et al., 1993), despite significant projections from area 18, the principal target of Y-type LGN input (Dreher et al., 1980; Dreher, 1986). It also shares its principal thalamic input, the LPI, with the posteromedial lateral suprasylvian area (PMLS; Symonds et al., 1981; Raczkowski and Rosenquist, 1983, Shipp and Grant, 1991). Both PMLS and LPI comprise highly direction selective neurons (Blakemore and Zumbroich 1987; Gizzi et al. 1990a, b; Casanova et al. 1989; Minville and Casanova 1998; Li et al. 2000, 2001; Brosseau-Lachaine et al. 2001; Dumbrava et al. 2001; Villeneuve et al., 2006). This connectivity suggests that area 21a could also be part of pathways involved in motion analysis as PMLS cortex. A number of electrophysiological studies have indeed reported the presence of direction selective cells in this area. However, most authors concluded that the proportion and selectivity of these cells preclude one from considering area 21a as a motion area (Mizobe et al., 1988; Winborne and Henry, 1992; Toyama et al., 1994; Tardif et al., 1996; Wang and Dreher, 1996; Morley and Vickery,

1997). These observations may stem from the possibility that highly direction selective neurons in area 21a may be clustered in islands that could easily be missed in electrophysiological studies. Thus, the contribution of area 21a cells in motion analysis is still a matter of debate.

In this study, we have further investigated the role of area 21a in visual processing using optical imaging. By visualizing the global functional architecture of a cortical area, optical imaging avoids the needle-in-a-haystack problem which characterizes single-cell examination of neuronal properties such as direction selectivity. Therefore, the functional organization of key components of visual processing (such as orientation and direction selectivity, spatial frequency (SF) selectivity, and domains size) was evaluated in area 21a and compared to that found in the primary visual cortex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal preparation

All procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals, and the experimental protocol was accepted by the Ethics Committee of the Université de Montréal. The animal preparation has been described in details in previous reports (Villeneuve and Casanova, 2003; Villeneuve et al., 2006). Briefly, thirteen normal adult cats weighing 2.5 - 3.5 kg were used. Cats were premedicated with a subcutaneous injection of acepromazine maleate (Atravet™ 1.0 mg/kg) and atropine (0.4 mg/ml; 0.1 ml/kg). Thirty minutes after this injection, anesthesia was induced by inhalation of 5% of isoflurane (Forane®) mixed with O₂/N₂O (50:50) and gradually lowered and maintained at 2% for the initial surgery. Following cephalic vein cannulation and tracheotomy, muscular relaxation was induced by injecting gallamine triethiodide (2%). Throughout the experiment, the animal was artificially ventilated using a respiratory pump (Ugo Basile, 6125) with an O₂/N₂O (33%/66%) mixture supplemented with agent-specific Tec5-Ohmeda vaporizer of halothane 0.5% (Fluothane®). Isoflurane was changed to halothane at the end of the surgical procedure as it is less detrimental to neurons' responsiveness (Villeneuve & Casanova, 2003). End-tidal CO₂ partial pressure was monitored by a capnometer (Ohmeda 5250

RGM) and kept constant between 30 and 38 mmHg by adjusting the rate and stroke volume of the respiratory pump. The core temperature was maintained at $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ by means of a feed back-controlled heating pad. The animals were continuously infused with 5% dextrose in lactated Ringer's injection solution containing gallamine triethiodide (50:50, 20 mg/kg/h). Pupils were dilated with atropine sulfate 1% (Isopto[®]) and the eyes were protected using contact lenses of appropriate refractive power.

Craniotomies were centered over the posterior part of the suprasylvian sulcus, at Horsley-Clarke coordinates AP +17 to -10 and ML 0.5 to 18, and the dura was removed for optimal visualization of the cortex. A large custom-made recording stainless steel chamber was used to simultaneously map the activity of several cortical areas (Figure 1). The internal aperture was 20 x 27.5 mm, allowing the recording of area 21a as well as primary visual areas 17 and 18 optical signals. The chamber was made rectangular to take advantage of the fact that the recorded images by the CCD are indeed rectangular, therefore optimizing the whole process.

The components of the recording compartment are presented in panel A and consist, from top to bottom, of four screws and small o-rings, a stainless steel cover plate, a large o-ring, a glass cover slip, a second large o-ring, and the chamber frame. Two of the screw holes on the frame (*a*, *b*) are connected to the internal aperture of the chamber. One of the four screws is a "filling-screw" (*b'*), i.e. it has a hole in its center which provides access to the inside the chamber when closed (see panel B). This screw is connected to a silicone oil-filled syringe via a stainless steel tube made from an 18G1½ needle. The chamber frame was solidly attached to the skull with dental cement (Stoelting Co.). The first o-ring and filling screw were secured and the chamber was filled with silicone oil (Polydimethylsiloxane, 200® fluid, viscosity 350 cSt, Sigma-Aldrich, inc). Once the oil was cleared of air bubbles, the cover glass was put in place, followed by the second o-ring and the steel cover plate. The two fixing screws (*c'*, *d'*) were tightened. Any excess of silicone oil in the chamber will then leak through the unobstructed screw hole (*a*). The final screw (*a'*) was then placed to seal the chamber. This whole configuration allows maintaining a stable intracranial pressure within the recording chamber.

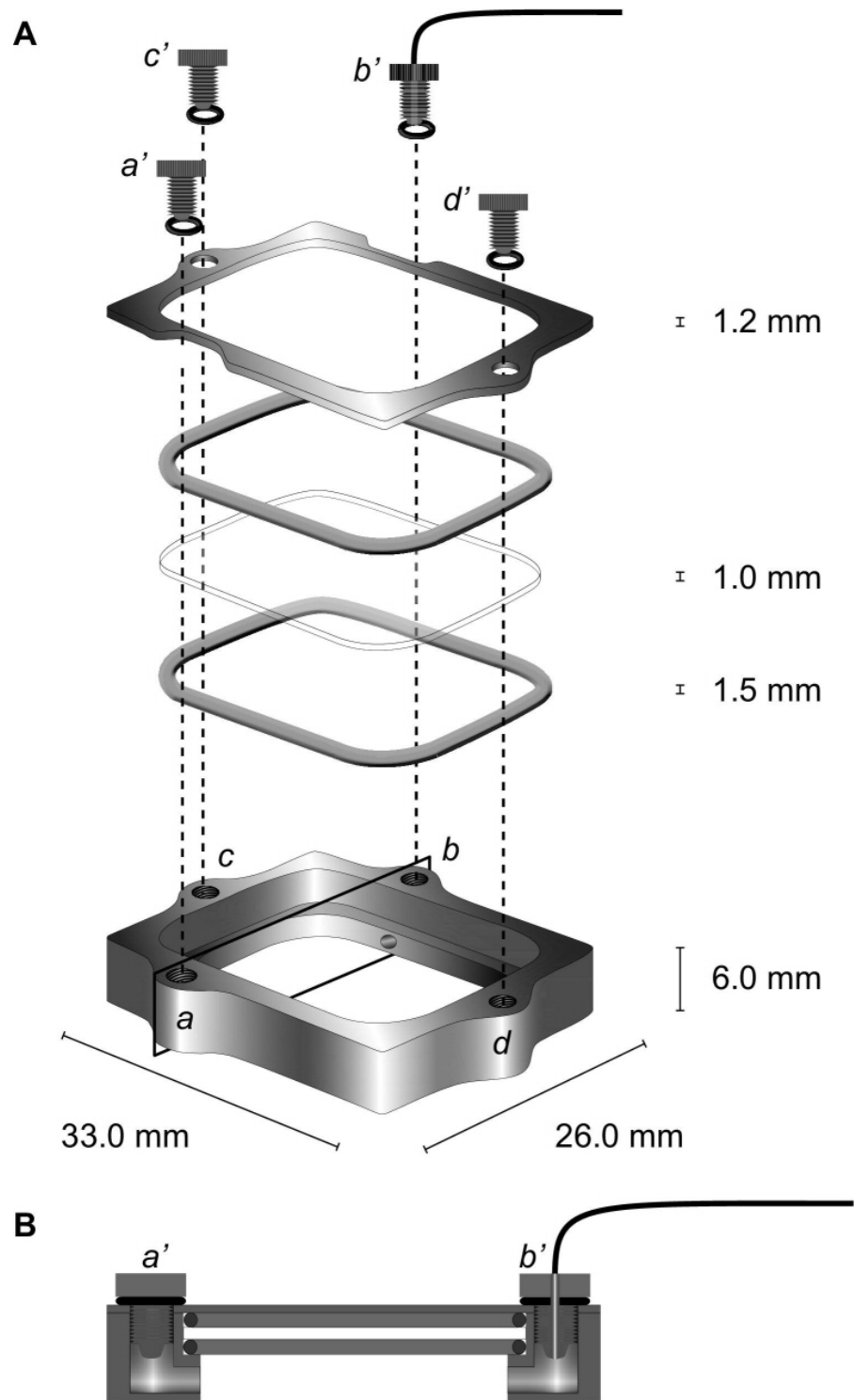


Figure 1. The custom made recording chamber. (A) Components of the chamber. (B) Cut-through view of the chamber at the level indicated in A, through the holes giving access to the inside of the chamber when closed. Details are in text.

Visual stimulation

Stimulation was provided by in-house visual stimulation software (StimPlus v1.0) developed in Python programming language. The stimuli were presented on a computer screen (View Sonic Graphics Series G220**f**, 1024 x 768 pixels, 85 Hz, average luminance of 25cd/m²) centered 28.5 cm in front of the animal's eyes, and subtending 80 x 60 deg of visual angle. Visual stimuli consisted of (1) drifting sine-wave gratings which varied in orientation (0 to 360 deg), spatial (0.05 to 1 c/deg) and temporal frequencies (1 to 6 Hz), while contrast was held constant at 100%; (2) random dot kinematograms (RDK) which consisted of a rigidly translating random dot field with no noise on a black background (100% contrast). Each dot had a size of 1° of visual angle and the dot density was 3 dots/in², a value optimal for cells in area 18 (Galuke et al, 2002).

For all conditions, full-screen stimuli were presented binocularly. During each test, the activity to a blank screen (baseline of equal mean luminance) was recorded. In case of the RDK paradigm, the baseline level was acquired when the RDK was static.

Data acquisition and processing

Functional images were taken by uniformly illuminating the cortex with a 700nm light (BP 30). Images were captured using a twelve-bit CCD camera (Dalsa 1M60, Colorado Springs, USA) coupled with a real macro lens (Nikon, AF Micro Nikkor, 60mm, 1:2.8D). The macro lens was used to increase the field of view, allowing the simultaneously recording of optical signals from areas 17, 18 and 21a. The focus was set at about 600µm below the cortical surface of area 21a for functional data. In a few cases where only primary visual areas were imaged, the focus was made on area 18. Five video frames (1.6s/each) were taken during the 8s presentation time of the stimulus. Interstimulus conditions consisted of the next stimulus presented for 10s in a stationary manner.

All images were low-pass and high-pass filtered with a difference of Gaussian kernel of adjusted size to remove low and high-frequency noise. The size of the filters was automatically determined for orientation and direction

conditions to fit the size and spatial periodicity of the module (also called domains thereafter) for each area. To get the size of the module, line profiles of activity were constructed from unfiltered single-condition maps (averages of 20 to 60 trials). For orientation, the raw data were summed up for the same-orientation-opposite-direction (i.e., the activations produced by gratings of the same orientation but of opposite directions), normalized to the sum of the data for all stimulus conditions. The grey values distribution was clipped ± 3 standard deviation around the average grey value and rescaled to the range between 0 and 1. For direction, identical calculations were made with the exception of the same-orientation-opposite-direction images which were not summed up. The line profiles of activity were constructed on the resulting single-condition maps by starting the line at one domain center and ending it at the adjacent domain center. The domain center was determined automatically, i.e. the observer first selected a domain and the pixel within this domain with the lowest values (from 0 to 1) was considered as the center. Then the same procedure was applied to the adjacent domain to complete the line profile. This procedure was used to get the module size and therefore the appropriate filter size to remove noise not related to the activation (spatial and temporal variation of blood volume, uneven illumination, camera noise, vasomotion). Other parameters were taken along this module size measurement: center-to-center distance, inter-domain spacing, and overlap ratio. The distribution of each parameter in the three areas was first compared using the analysis of variance with one repeated factor line profiles from single-orientation map with three levels (area 17, 18 and 21a) followed if necessary by a Tukey-Kramer contrast procedure for each pair (17-18; 17-21a; 18-21a). All analyses were done with mixed procedure of SAS version 9.1 with a significance level of 5%.

The periodicity and size of the modules were also evaluated by autocorrelation analysis (Mc Loughlin and Schiessl, 2006), where a copy of a map is placed on top of itself and the differences between the two images are calculated. A perfect alignment of the copy and original maps results in an autocorrelation of 1.0, each pixel matching its counterpart. When the copied map is displaced relative to the original, the level of correspondence decreases and the autocorrelation is reduced. A complete autocorrelogram is obtained by

incrementally shifting one image relative to another, in the X and Y dimensions, and computing a correlation coefficient at each offset location. If a map contains recurring structures, i.e. a modules, the distance between modules can be calculated from the center of the autocorrelogram (McLoughlin and Blasdel, 1998). The measures obtained with autocorrelation analysis confirmed those obtained by line profile analysis.

Selectivity analysis was based on the least-square fitting method developed by Swindale (Swindale, 1998; Swindale et al., 2003). The general framework was to recover, at each location in the image (i, j), the best fitting single von Mises function for orientation or double von Mises functions for direction tuning. Pre-processing of the images consisted of summing two same-orientation-opposing-direction conditions for orientation selectivity. The resulting images were divided by the blank condition (equi-luminance) and filtered (difference of Gaussian kernel). Normalization by the cocktail blank was avoided, as this deletes information about the tuning height (Swindale et al., 2003).

The optical response of each pixel (i, j) in the image, measured for one of N directions of motion, was analyzed. Single circular normal functions (von Mises) describe well orientation tuning curves (Swindale et al., 1998). Therefore, the von Mises function with parameters describing the position, height and width was used to determined orientation preference.

The von Mises function was determined by:

$$O(\theta) = A \cdot e^{k(\cos 2(\theta - \theta_p) - 1)} \quad (1)$$

where O is the model response, θ is the orientation of the grating, A is the maximum height of the tuning curve, θ_p is defined as the preferred orientation, and k is inversely related to the width $\theta_{0.5}$ of the tuning curve and determined by:

$$\theta_{0.5} = \frac{1}{2} \cos^{-1} \left(\frac{\ln 0.5 + k}{k} \right) \quad (2)$$

Direction preference was computed by the sum of two von Mises functions, unrestrained in their relative positions, widths and heights. The function was:

$$M(\varphi) = A_1 \cdot e^{k_1(\cos(\varphi - \varphi_1) - 1)} + A_2 \cdot e^{k_2(\cos(\varphi - \varphi_2) - 1)} \quad (3)$$

where M is the signal, φ is the direction of the stimulus, A_1 and A_2 are the heights of the individual peaks, φ_1 and φ_2 are the optimal directions of each peak and k_1 and k_2 are inversely associated to the widths of each peak.

The factors for amplitude, optimal direction and tuning width of each peak (A_1 , A_2 , φ_1 , φ_2 , k_1 and k_2) were varied to minimize the error root mean square (f^2) by *simplex* search method (Lagarias et al., 1998) under MATLAB (Mathworks, MA, USA):

$$f^2 = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (R'(\varphi_n) - M(\varphi_n, A_1, A_2, \varphi_1, \varphi_2, k_1, k_2))^2 \quad (4)$$

where R' is the normalized experimental data, M is the values from the model and N the number of conditions. The root mean square optimization was stopped at 500 iterations and A_1 was constrained so that it could not be greater than the highest data point. A tuning curve could then be extracted at every (i , j) location. For each tuning curves obtained, a baseline values (b_{ij}) was determined as the minimum response value for the pixel in question. Tuning height was therefore defined has the signal above the b_{ij} value.

$H(i, j)$ was determined as the difference between the maximum and the minimum values of the response at each position (i, j). H_{max} was labeled as the largest value of $H(i, j)$ taken over the entire map. Consequently, the tuning curves were rescaled so that every tuning curve in the map had a minimum value of zero and that all data points of all tuning curves in the map lie between 0 and 1. This was done by setting:

$$R'_{ij}(\varphi_n) = \frac{(R_y(\varphi_n) - b_{ij})}{H_{max}} \quad (5)$$

The orientation of the stimulus was described as the right angle of the direction of motion of the grating:

$$\theta = |\varphi + 90^\circ|_{180} \quad (6)$$

Direction preference was determined as the position (deg) of the highest peak, i.e. preferred direction was φ_1 if $A_1 > A_2$ or φ_2 if $A_2 > A_1$.

The amplitude of two orthogonal orientation responses (each orientation yielding two directions) was also measured for different SFs to establish the optimal SF for every pixel. Pixels with maximum response for the smallest/largest SF value tested were considered as low- and high-pass pixels, respectively. Otherwise, SF tuning response was fitted by a modified Gaussian function with the same least-square fitting procedure previously described for orientation and direction:

$$MG = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(f^n - m)^2}{2\sigma^2}} \quad (7)$$

where f is the SF tested, m is an argument linked to the mean, σ is associated to the bandwidth and n determines the shape of the modified Gaussian function. Then, the optimal SF evoking the maximum response was extract from this distribution.

Given the relatively large craniotomies performed in the present protocol, we developed an automated procedure that saves only the pixels with a stable and reliable functional response (discarding blood vessels and unresponsive pixels) into a region of interest (ROI) for further quantitative analysis (e.g., magnitude, orientation and spatial frequency patterns; Figure 2). A reference orientation map was computed with the least-square fitting method with all the summed trials (equations 1 and 2, panel A in Figure 2). The same procedure was completed for every trial separately (on average 20-60 trials), resulting in as many orientation maps as trials (panel B). The pixels were then compared between the separated trials maps and the reference map. The pixels kept were the ones where the optimal orientation was the same, in a predetermined range, in more than 70% of the separated trials maps in comparison to the reference map (panel C). The range was determined by resolution of the orientation conditions tested; 8 orientations (16 directions), giving a resolution and range of 22.5 deg. Therefore, for a given pixel, if the optimal orientation corresponded more than 70% of the time to the reference optimal orientation of the same pixel (within 22.5 deg), it was kept for quantitative analysis. It is noteworthy that singularities are more unstable in comparison to domains. Thus, regions with variability of their responses that

corresponded with singularities were kept for further analysis with a low-pass filter (D). The procedure was performed for each spatio-temporal parameter that best fitted the activity of a cortical area; consequently, ROIs for area 17, 18 and 21a could be easily identified and separated. This way, high responsive, but unstable regions (blood vessels) were automatically rejected from the analysis.

The direction maps obtained from dynamic gratings and RDK in a given animal were not always recorded the same day of the experiment and consequently, the camera could not be positioned at the exact same location between sessions. This could yield a spatial offset between images and/or an angular offset (rotation), as well as a variation of the viewing angle, precluding a direct comparison of the spatial patterns between images. This was overcome by registering the images by a "local weighted mean method" (Image processing toolbox, MATLAB (Mathworks, MA, USA)) which infers a polynomial deformation at each control point defined as blood vessel branches visible on the anatomical reference image. Then, this deformation matrix was applied on the functional image to allow an exact registering of the cortical positions.

At the end of each experiment, the animal was killed by an intravenous overdose of pentobarbital sodium (Euthanyl, 100mg/Kg).

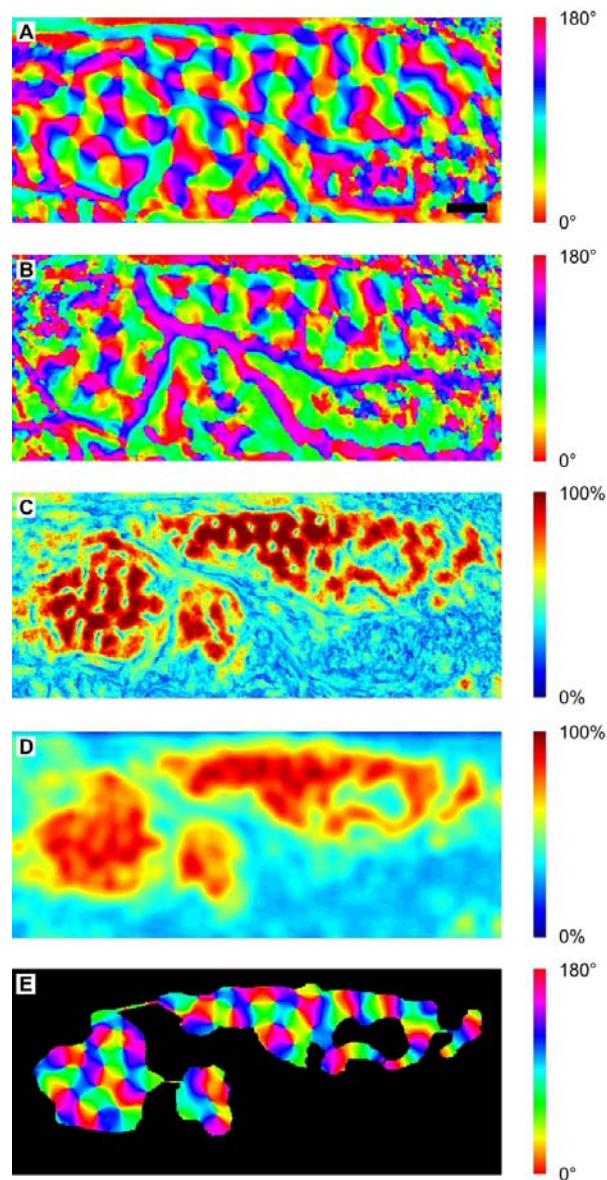


Figure 2. Automated delimitation of ROI. (A) Reference orientation map, produced by 165 repetitions of all conditions. A subset of 5 repetitions of all conditions produced the orientation map shown in (B). This is for 5 trials; it was also done for all 33x5 separated subset of 5 trials. (C) The comparison of the optimal orientation of all pixel for all individual subsets of 5 trials versus the reference map is shown in percentage; i.e. a pixel at 100% means that all individual subsets of 5 trials produce the same optimal orientation, within a given range (22,5 deg), when compared to the reference map. The location and variability of the pinwheel centers can be appreciated; i.e. a small zone of low percentage within a larger area of high percentages. (D) Image of panel C was low-pass filtered to include pinwheels, and to remove unreliable signal from large blood vessels. (E) ROI of activation, defined as pixels displaying the same preferred orientation in 70% or more of the trials, including pinwheels. Scale bar = 1mm.

RESULTS

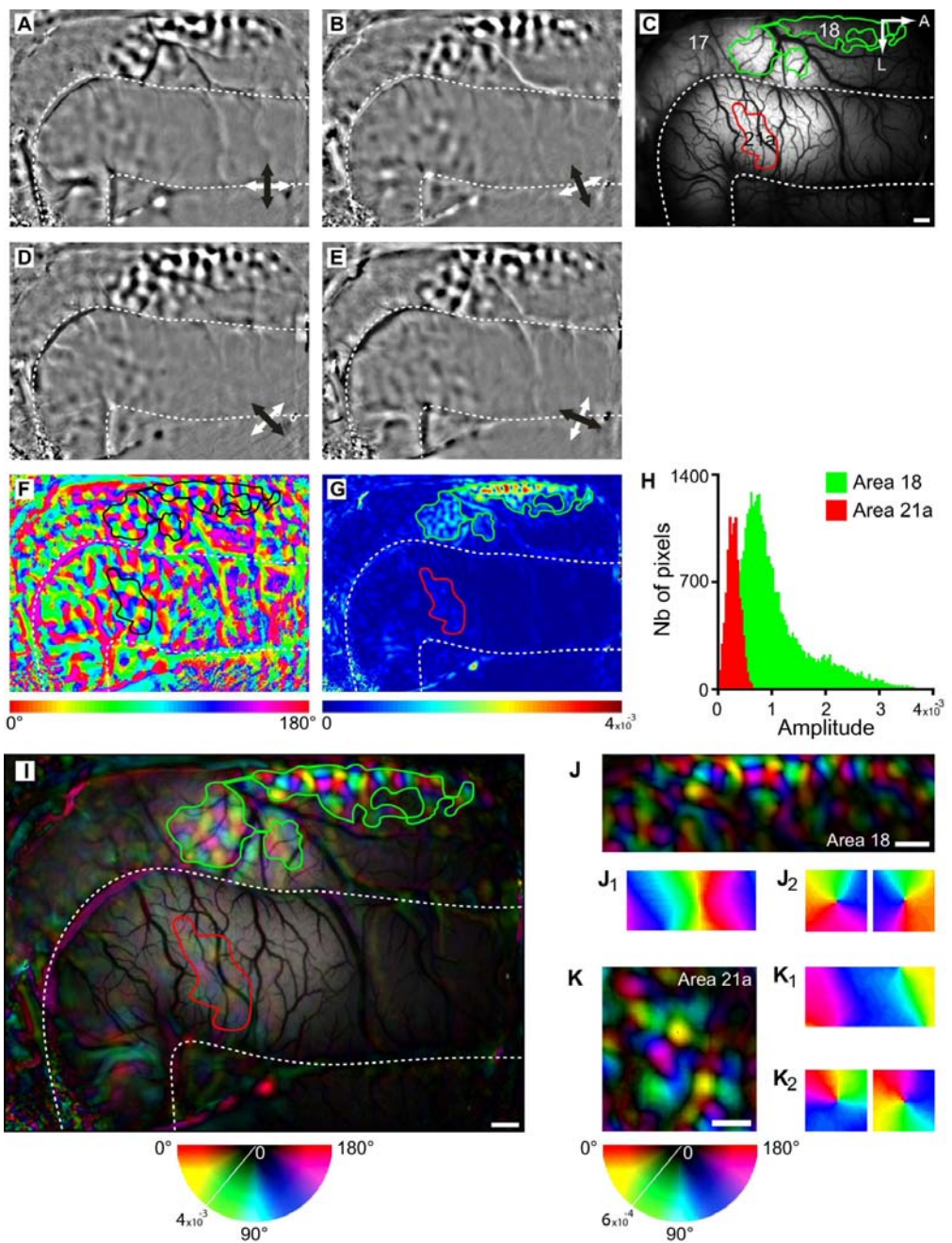
A modular organization of orientation preferences was clearly revealed in area 21a (Figure 3). Panels A-B and D-E show the orientation modules after visual stimulation with a 0.3 c/deg sine-wave grating drifted at a temporal frequency of 3 Hz. The most prominent modules could be seen on the lateral gyrus, corresponding mainly to area 18. A second modular organization could be observed on the caudal part of the suprasylvian gyrus, in area 21a. The two areas had stable functional responses, and consequently, ROIs were automatically delimited. The two ROIs are shown on the anatomical view of the cortex in panel C of figure 3 (green and red lines in areas 18 and 21a, respectively; the white dashed lines indicate lateral (medial) and suprasylvian (lateral) sulci). Pixel-wise analysis of orientation preference was carried out to discern the orientation preference map (optimal orientation at each pixel) and is shown in panel F (regions of interest are now delimited by black lines, for clarity). Panel G, shows the magnitude of the signal for each pixel, at the optimal orientation. The mean response strength is significantly greater ($p < 0.0001$; Mann-Whitney) in the ROI of area 18 (mean \pm SEM = $10.833 \times 10^{-4} \pm 4.52 \times 10^{-4}$; median = 8.84×10^{-4}) than that of area 21a ($2.67 \times 10^{-4} \pm 1.21 \times 10^{-4}$; median = 2.64×10^{-4}). It is important to restate that this activation was produced by a grating of 0.3c/deg, which corresponds to the optimal SF for area 21a (see below) but not for area 18 (preferred SF of 0.15 c/deg). Therefore, even when stimulated at non-optimal SF, area 18 presents a higher activation level than area 21a. This difference can be better appreciated in panel H where the distribution of the number of pixels is plotted as a function of signal amplitude for the two ROI (area 18 in green; area 21a in red). The orientation preference map (F) was scaled according to the strength of the response (G) and superimposed on the anatomical image (panel I). This gives a clear view of the modular organization in area 18, and to a lesser extent in area 21a. To better appreciate this organization, parts of the optical image of the lateral gyrus (area 18; panels J) and of the caudal region of the suprasylvian gyrus (area 21a; panels K) were magnified. The basic attributes of the orientation maps were common in the two areas; both contained linear zones (J1 and K1) and singularities (J2 and K2; clockwise (left) and counter-clockwise (right)).

Consequently, the general organization of orientation domains in area 21a is comparable to that of the primary visual area 18.

Direction selectivity

The presence of direction domains was investigated both with drifting gratings and RDK. Results are presented in figure 4. The top panels (A and B) present orientation preference maps for area 18 and 21a. In these cases, modules can be easily delimited. Panels C and D present direction preference maps for the same zones described above. While direction domains could be clearly identified in area 18, no clear organization emerged in area 21a. This observation stands whether drifting gratings (panels C, D) or RDK (panels E, F) were used for visual stimulation, even if the speed of the dots comprising the RDK was varied and covered the range of preferred velocities of area 21a cells (Dreher et al., 1993; 4, 8, 12, 16, 20 and 24 deg/sec; data not shown). Based on directional responses, no ROI could be identified in area 21a, i.e. the response was unreliable. Conversely, a clear ROI for direction could be automatically delimited in area 18, confirming the presence of reliable direction signals in area 18. These data strongly suggest that area 21a does not play a prominent role in the analysis of the direction of motion of an image.

Figure 3. (*page suivante*) (A-B, D-E) Iso-orientation images obtained for eight gratings (SF=0.3c/deg TF=3Hz) orientations (0/90, 22.5/112.5, 45/135, 67.5/157.5 deg; 60 repetitions) in one animal. In each panel, signals obtained for orthogonal orientations are represented by dark and white domains (see corresponding arrows). The upper and lower white small-dash lines represent the lateral and the suprasylvian sulci, respectively. (C) Reference image of the right hemisphere with the ROIs of area 18 (green line) and 21a (red line). The illumination used was not that used for the functional recordings. (F) Orientation preference map obtained by best-fitting a von Mises function according to the color scale at the bottom of the panel (0-180 deg). An overrepresentation of cardinal orientations was observed in 21a (G) Magnitude of the optical signal obtained by the same method (0- 4×10^{-3}). (H) Distribution of the number of pixels within each ROI (area 18: green; area 21a: red) in relation with the amplitude of the signal. (I) Orientation preference map normalized by the amplitude of the signal, superimposed on the reference image. (J) A magnification of area 18 orientation preference map and common characteristics of orientation preference maps (same scale as in I): linear zones (J1) and pinwheel arrangements (J2). (K) The amplitude of response was normalized and area 21a orientation preference map was magnified. K1, common characteristics of orientation preference map K2, pinwheel arrangements (clockwise and counter-clockwise). Scale bars = 1mm.



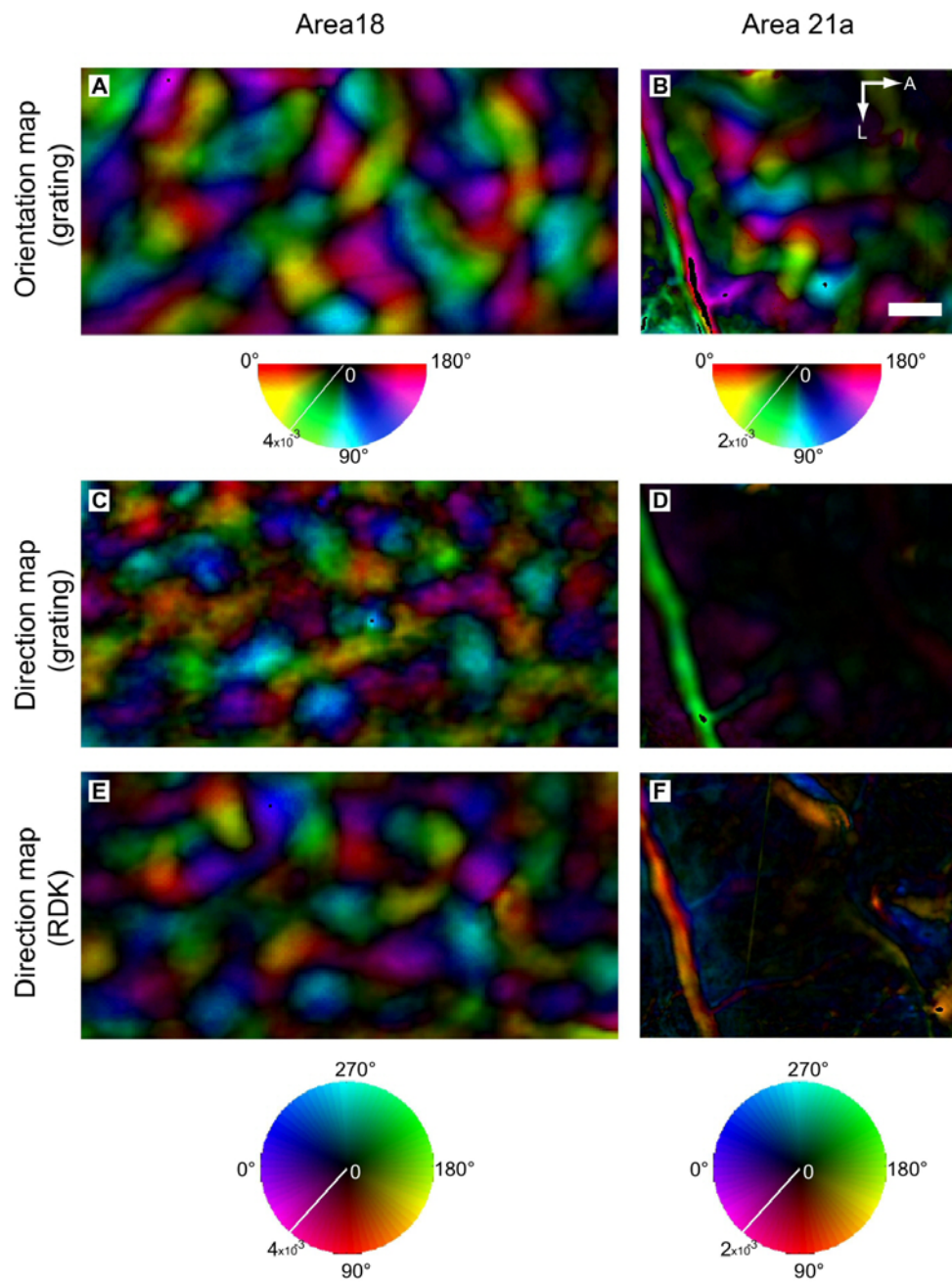


Figure 4. The left column (panels A, C, E) presents the cortical organization of area 18 to orientation (gratings), directions (gratings), and RDK, respectively. The same is shown in the right column (panel B, D, F) for area 21a. 60 replications. Scale bars = 1mm.

Spatial frequency maps

The large recording chamber allowed investigation of the organization of spatial frequency selectivity over a large number of visual cortical areas. Figure 5 presents the functional maps obtained for sine wave gratings whose SF was varied from 0.05 to 1.0 c/deg in 11 steps, at a temporal frequency of 3 Hz. The location and limits of the gyri and sulci are identified by dashed lines in panel A. Each panels (A-K) show the amplitude of the response and its location on the cortex for each SF. Low SF gratings activated mainly the anterolateral parts of the lateral sulcus (area 18) while higher SF gratings activated preferentially the posteromedial regions (area 17). Note that the intrinsic optical signal responses in area 21a (indicated by the ROI) are very small when compare to that of primary visual areas, and consequently, prevent its visualization in panels A-K. In order to appreciate responses, the optimal SF map presented in the panel L was not scaled to the amplitude of the response. The medial part of the lateral gyrus, corresponding to area 17, is characterized by high optimal SF preferences (turquoise/yellow) whereas the lateral part of the lateral gyrus, corresponding to area 18, shows lower optimal SF selectivity (blue/dark blue). Area 21a was preferentially activated by low SF (mainly blue). The two white rectangles in panel L identified a region of the cortex comprising parts of area 17 and 18 (upper rectangle) and area 21a (lower rectangle). Activations within these rectangles are presented in figure 6 (panel A for the lateral gyrus, panel B for area 21a). SF tuning curves were computed for 8 groups of pixels situated at different locations in areas 17-18 and 21a.

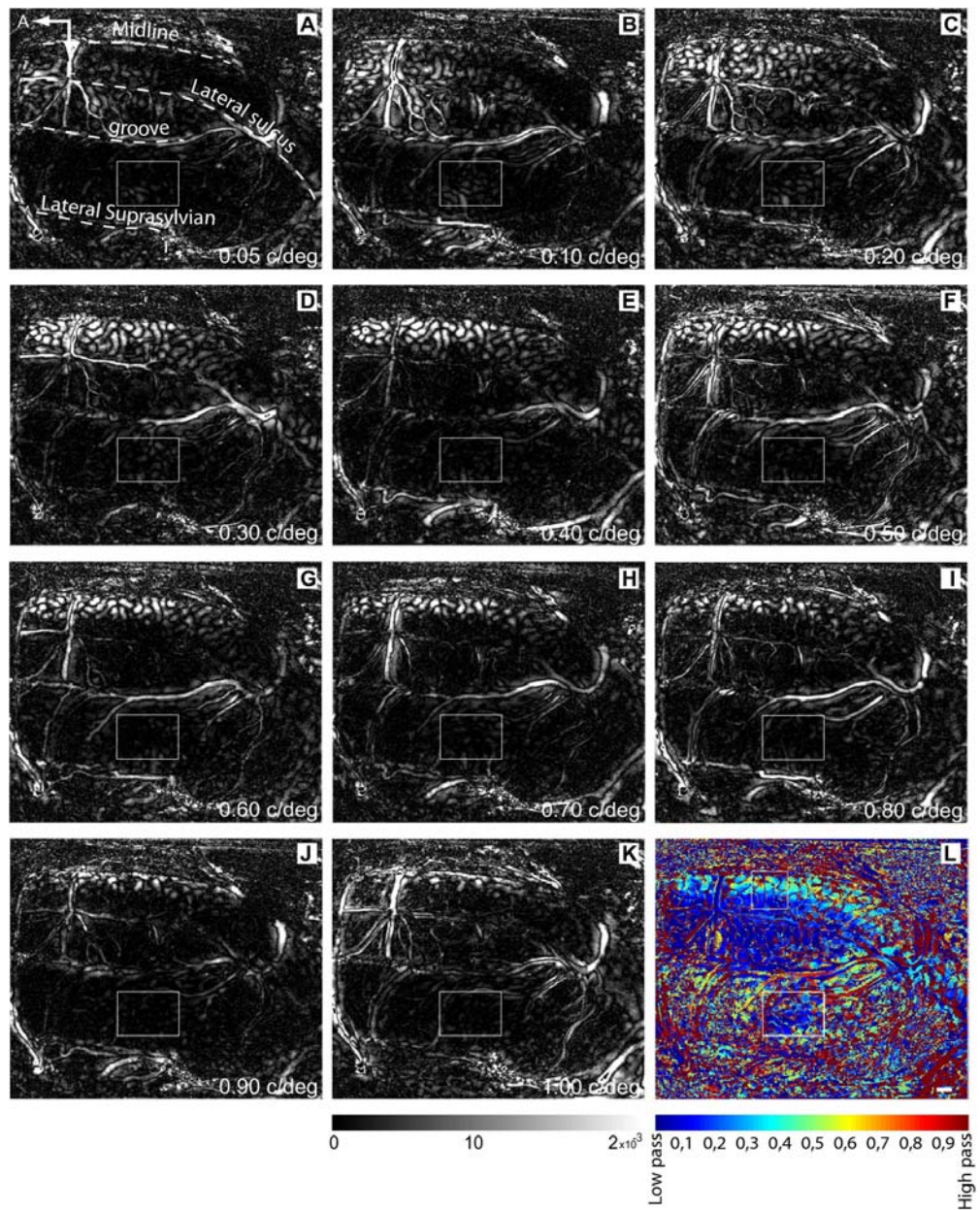


Figure 5. Panels represent the amplitude of the response when activated by a grating at a SF indicated in the lower-right side of each panel. (L) SF map in which the color represents the optimal SF, according to the color scale. 60 replications. Scale bars = 1mm.

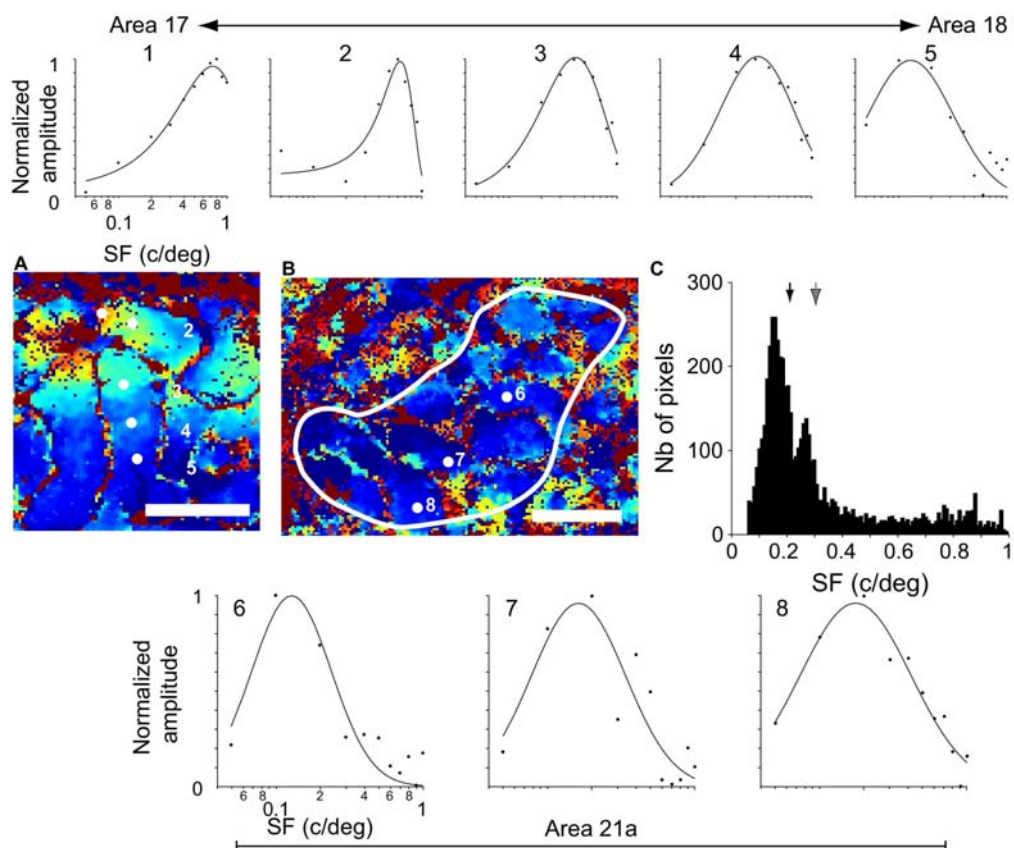


Figure 6. A & B: Magnification of the selected areas (rectangles) in figure 5. Examples of tuning curves for SF are presented on the top of the figure for primary visual areas (area 17 and 18) and on the bottom for area 21a. In all graphs, the normalized response amplitude is represented for all tested SF, in c/deg (from 0.05 to 1). (C) Distribution of the optimal SF in area 21a (mean = 0.30c/deg (grey arrow), SEM = 0.003c/deg; median = 0.21 (black arrow)). The distribution comes from the activated area in area 21a (ROI illustrated by the solid white line in panel B). Band-pass pixels (65%) only are presented in the distribution. Low- (28%) and high-pass pixels (7%) were removed. Scale bars = 1mm.

Each group (illustrated by the numbered dots) consisted of the mean response of four pixels. When moving from the medial to lateral part of the lateral gyrus (i.e. from area 17 to 18, dots 1-5), there was a clear change from high to low optimal SF values. There were no such changes within area 21a as the vast majority of pixels were tuned around 0.3c/deg, as shown by the tuning curves 6-8. The distribution of the number of pixels as a function of the optimal SF in area 21a, quantified within the automatically defined ROI illustrated by the white line in 5B, is presented in panel C. The mean \pm SEM was 0.30 \pm 0.003c/deg (gray arrow) and the median was 0.21 (black arrow). Only band-pass pixels were evaluated since we could not differentiate between low-, high-pass pixels and noisy data. The distribution of optimal SF in areas 17 and 18 are not presented, since the main criterion to differentiate the two areas is the optimal SF itself.

Orientation domain characteristics

The spread of activity of a single orientation domain could be used as a general view of the underlying orientation tuning of the neuronal response: broadly tuned neurons would lead to large orientation domains and to greater overlap between domains, whereas narrowly tuned neurons would have the opposite effect (Rao et al., 1997). Analyses of line profiles were performed from single-orientation maps in area 21a and in the primary visual cortex (panel A of figure 7). Several parameters could be extracted from a single line profile (panel B): center-to-center distance of adjacent domains (distance between the extremities of the line profile), inter-domain spacing (full-width at half-height of the line profile), orientation domain size (center-to-center distance *minus* inter domain spacing), and more interestingly, a ratio of orientation domain size relative to center-to-center distance (overlap ratio). This ratio may serve as a general measure of orientation tuning width of the underlying neurons within a particular area.

Panels C-D of figure 7 present data obtained from 355, 1061 and 207 line profiles for areas 17, 18 and 21a, respectively in 13 animals. For center-to-center distances (panel C), analysis of variance indicated a significant difference between the three areas ($p = 0.015$). A following tukey-kramer

contrast procedure showed difference between areas 17 and 18 only ($p = 0.023$); mean values \pm SEM were: area 17, 1.10 ± 0.04 mm; area 18, 1.04 ± 0.04 mm; area 21a, 1.10 ± 0.04 mm). The same analysis was done for inter-domain spacing (not shown). A significant difference was first noted between the areas ($p = 0.007$) and subsequent analysis indicated a difference between areas 17 and 18 only ($p = 0.023$) (mean of 0.68 ± 0.03 and 0.62 ± 0.03 mm, respectively). The inter-domain spacing value in area 21a were 0.66 ± 0.03 mm. Domains' size (area 17, 0.43 ± 0.01 ; area 18, 0.42 ± 0.01 , area 21a, 0.43 ± 0.02 mm; not illustrated) was not significantly different between the three areas (analysis of variance, $p = 0.69$). Finally, the ratio between the domain sizes relative to the center-to-center distances (overlap ratio, panel D) was not significantly different between areas ($p = 0.35$). Overlap ratio values were 39.6 ± 0.9 , 40.6 ± 0.8 and $40.3 \pm 1.1\%$ in areas 17, 18 and 21a, respectively.

The absence of difference in the overlap ratio, which is a general indication of the underlying neurons orientation tuning width measured through optical imaging intrinsic signals, suggests that area 17, 18 and 21a neurons are equally tuned for orientation. Taken together, these orientation domain characteristics suggest that orientation is not processed at different scales within cortical areas 17, 18 and 21a.

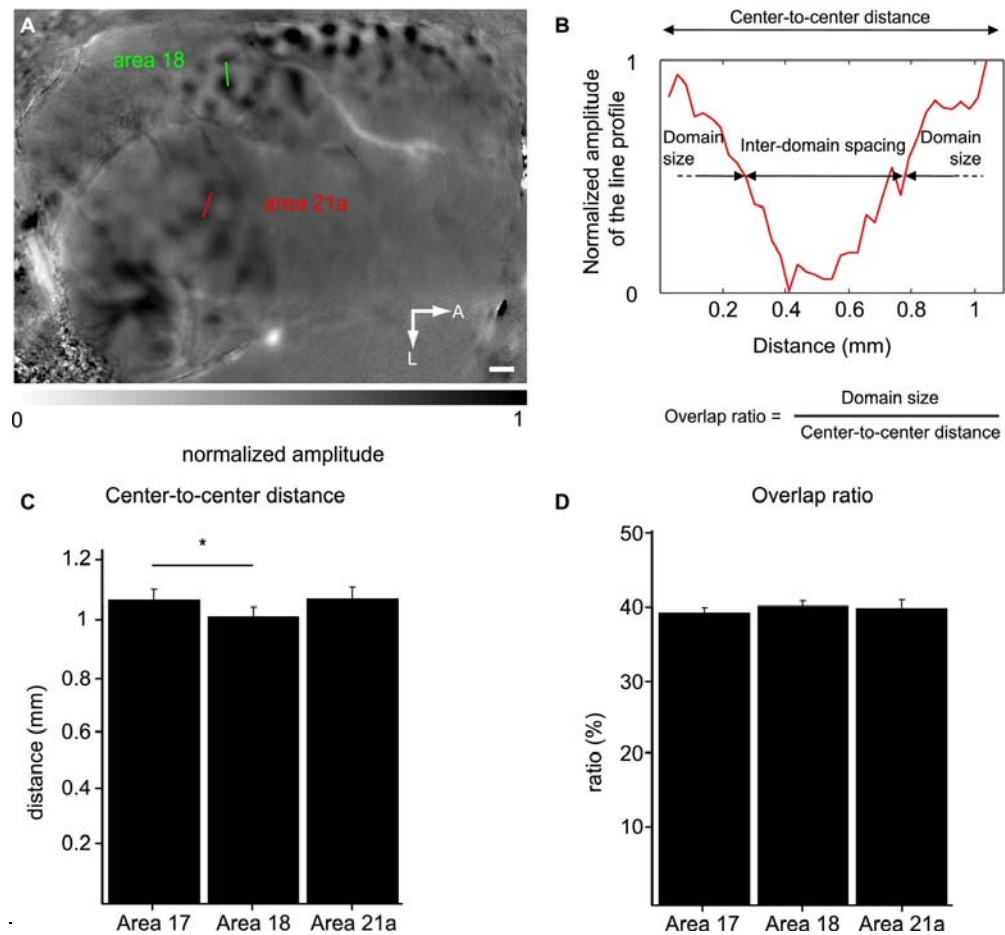


Figure 7. Orientation domain characteristics in areas 17, 18 and 21a (A) Example of automatically drawn line profiles on an unfiltered single-orientation map in area 21a (red) and in area 18 (green). (B) Variation of the signal (scaled between 0 and 1) along the red line (area 21a) shown in panel A. The measured parameters are illustrated on the graph. (C) Distances in mm between a domain center to the center of an adjacent iso-orientation domain, for all single-orientation maps in area 17, 18 and 21a. (D) Ratio between the domain sizes over the center-to-center distance, in percentages. Greater ratio indicates a greater overlap between iso-orientation domains of different orientation, therefore broader orientation tuning. (*= $p < 0.05$).

DISCUSSION

This study revealed the presence of well-defined and organized orientation modules on the posterior part of the suprasylvian gyrus. The location, size, shape and functional properties of the activated region correspond to area 21a as defined by others using neuroanatomical, electrophysiological and imaging approaches (Dreher et al., 1993; 1996; Tardif et al., 2000; Wang and Dreher, 1996; Wang et al., 2000; Van Der Gucht et al., 2001; Galuske et al., 2002; Harutiunian-Kozak et al., 2002; Hashemi et al., 2003; Grant et al., 2005; Huang et al., 2006; Kayser and König, 2006). In all these studies, the localisation of area 21a does not vary significantly in relation to sulci and gyri landmarks. In the present study, the identification of area 21a was facilitated by the use of a large recording chamber.

The organization of orientation in area 21a resembles that observed in areas 17 and 18 using the same stimuli. However, in contrast to area 18, no direction domains were identified in area 21a. Overall, the data presented here support the assumption that area 21a plays a more important role in form rather than motion processing pathways. Our findings agree with those of Huang et al. (2006) who, using a comparable experimental approach, reported the existence of a modular organization for orientation preferences in 21a with an overrepresentation of cardinal orientations. While this study provided valuable data, it did not address key properties such as direction selectivity and spatial frequency tuning. In addition, the recording chamber used was small, leaving accessible parts of area 21a unevaluated. Finally, no “region of interest” analysis was made, preventing a thorough assessment of orientation organization within area 21a.

Technical considerations

One advantage of optical imaging is the ability to record from extended regions of the cortex in a single run. In the present study, we have increased this potential by using a large chamber encompassing several areas. In most published studies, the field of view is circular and around 15-30 mm², which only permits the analysis of small parts of a cortical area, leaving accessible

zones (other than those buried within the sulci) unevaluated. Here, we could measure optical signal over a rectangular surface of 300mm² (20 x 15 mm), allowing the analysis of a number of cortical areas in a single experiment. Thus, signals from areas 17, 18 and 21a could be recorded in the same session, and the large field of view represents a powerful way to delineate functional borders of cortical areas. While the recording chamber allowed us to visualize most of cortical areas 7 and 19 (Reinoso-Suárez's atlas, 1961), no significant activation of these areas was noted, perhaps due to the nature of the stimuli used or to increased sensitivity of these areas to anesthesia. One disadvantage of increasing the field of view is augmenting the amount of noisy and irrelevant signals. This problem was overcome by the automated ROI procedure developed here, which is a simple and effective tool to select functionally stable pixels for quantitative analysis and discard noisy ones.

Signal amplitude

The magnitude of the optical signals evoked by gratings in area 21a was lower than those in area 18 (as shown in figure 3). Based on data obtained in the same animal at the same time, response amplitude was about four times greater in area 18 than 21a. This tendency was previously reported from electrophysiological data by Dreher et al. (1992, 1993) and to a lesser degree from optical imaging signals by Huang et al., (2006). The former authors showed that responses of cells in area 18 are 2.6 times more robust than those in 21a (area 18 = 84.4sp/sec (SD=54.1); area 21a = 33 sp/sec (SD=26.2)). Despite the fact that synaptic activity and not spiking activity is considered as the main contributor to intrinsic signal responses (Logothetis et al., 2001), data from optical imaging and electrophysiology are similar.

Direction selectivity

As stated by Kisvarday et al. (2001), drifting gratings are usually used to evaluate direction maps. However, this periodic stimulus carries both orientation and direction signals. The use of RDK is thus a better alternative since this stimulus does not contain *a priori* any specific orientation information, even though it is known that, when in motion, RDKs contain

some velocity-dependent orientation energy (e.g., see the review of Issa et al., 2008). RDK has proven to be efficient in driving cortical cells (Villeneuve et al. 2006) and in defining direction tuning of neurons (compared to bars or gratings (Skottun et al., 1988)). Despite the use of two types of moving stimuli (gratings and RDK) and varying key parameters such as velocity, we could not find any locus of direction selectivity in area 21a. One may argue that the absence of direction maps comes from the fact that signal amplitude in area 21a was smaller than that in the primary visual cortex, and that direction maps tend to be less robust than orientation maps in area 18 (Shmuel and Grinvald, 1996). We cannot exclude that direction signals were below threshold for detecting selectivity signals in area 21a in our experimental preparation but this seems unlikely for the following reasons. While we observed that, in area 18, direction vectors strength was three times lower than orientation vectors when drifting grating were used (in accordance to Shmuel and Grinvald, 1996), we also measured that direction vectors strength was three times stronger when RDK rather than drifting grating were presented. Thus, in area 18, the signal to noise ratio in RDK direction maps was equal to that in grating orientation maps. Furthermore, electrophysiological data (Mizobe et al., 1988; Wimbome and Henry, 1992; Toyama et al., 1994; Wang and Dreher, 1996; Morley and Vickery 1997) demonstrate that most area 21a cells do not exhibit strong direction selectivity tuning (however, no RDK were used to study direction selectivity in those studies). Finally, we used a battery of stimulus with spatio-temporal parameters known to optimally stimulate area 21a (Tardif et al., 1996; Morley and Vickery, 1997), and we previously recorded strong direction selective responses in PMLS neurons (Villeneuve and Casanova, 2006) with the exact same stimuli used in the present study. Another possibility which could explain the absence of any direction domains is the observation that the few neurons with high direction selectivity indices are sparsely distributed (Dreher, 1986; Dreher et al., 1993; Dreher et al., 1996).

The absence of direction domains does not necessarily exclude area 21a from motion processing as suggested for cells in area V4 of the macaque, the proposed analogue of area 21a (Payne 1993). Neurons in V4 are generally not direction selective when tested in a classical manner. However, these neurons

develop direction selectivity after motion adaptation (Tolias et al., 2006). Nevertheless, the large-scale evaluation of direction selectivity in area 21a made by optical imaging, associated to the fine-scale investigation by single cell recordings (Mizobe et al., 1988; Wimbome and Henry, 1992; Toyama et al., 1994; Wang and Dreher, 1996; Morley and Vickery 1997), strengthen the proposed notion that the principal role of area 21a is in form rather than motion discrimination. The organization of specific properties in modules is considered a strategy to enhance processing (Koulakov and Chklovskii, 2001): consequently, the absence of robust direction maps in area 21a would indicate that the analysis of direction of motion is not optimized in this extrastriate area. As such, area 21a would be an integral part of the ventral pathway (Lomber et al., 1996; 2001).

Spatial frequency organization

The use of a fitting method for spatial frequency analysis allowed continuous mapping of the targeted cortical areas, while reducing noise. It was thus possible to produce a finer evaluation of the organization of SF selectivity over the visual cortex. To our knowledge, only two electrophysiological studies investigated the optimal SF of area 21a cells and they reported comparable mean values (0.36, c/deg, Tardif et al., 1996; 0.27 c/deg, median of 0.17, Morley and Vickery, 1997). Using optical imaging, we found mean and median values (0.30c/deg and 0.21 c/deg) which corresponded closely to those computed from single-cell recordings. Our SF values for areas 17 and 18 also match previous electrophysiological (Movshon et al., 1978; Berardi et al., 1982; Tolhurst and Thompson, 1982) and optical imaging data (Issa et al., 2000).

In previous studies, the arrangement of optimal SF in primary visual areas of the cat was reported as laminar (Maffei and Fiorentini, 1977), clustered (Tolhurst and Thompson, 1982), or columnar (Tootell et al., 1981; Bonhoeffer et al., 1995). It is still unclear whether SF is organized in modules relative to the X and Y pathways (Bonhoeffer et al., 1995; Hübener et al., 1997; Shoham et al., 1997) or if it is represented uniformly (Everson et al., 1998; Issa et al., 2000). On the basis of the data presented here (figures 5, 6), it

is likely that the functional cortical organization of optimal SF is characterized by uniformity and continuity. It was shown that the pooling of orientation images over different SFs used in many studies (Hübener et al., 1997; Shoham et al., 1997; Everson et al., 1998) produces a disproportionate representation of low and high SF (Issa et al., 2000; Sirovich and Uglyesich, 2004), explaining the discrepancies between optical imaging studies on SF organization. In the present study, we used a blank stimulus to normalize the SF data, as in Issa et al. (2000), and found a similar ‘continuous’ representation of optimal SF. Issa et al. (2000) also reported the presence of domains of extreme low and high SF associated with pinwheel centers in primary visual areas. A similar relationship was present in our study in areas 17 and 18. However, extreme low and high SF (low-pass and high-pass) pixels were not considered for analysis in the present work, since we could not differentiate between real low- and real high-pass pixels and noisy optical signals which are prominent at pinwheel centers.

Spatial spread of activity

The physical characteristics of the orientation domain were analyzed with the method developed by Rao et al. (1997). They found a center-to-center distance between domains of 1.07mm in area 17, comparable to our measurement of 1.10mm. Huang et al. (2006) reported that the minimum intervals between pinwheel centers in area 21a were smaller than those in area 17, in disagreement with our findings that there was no significant differences between domains’ characteristics in area 17 and 21a (nor between areas 18 and 21a). Area 17 center-to-center values were greater than those in area 18, likely due to the presence of a greater pinwheel density in area 18 (Löwel et al., 1987; Bonhoeffer and Grinvald., 1991; Bonhoeffer et al., 1995). While the inter-domain spacing in area 21a was not significantly different from that in area 18 and 17, it was however different between areas 17 and 18, domains being more spaced in area 17. Based on the overlap ratio, area 21a neurons would present tuning curves not significantly different from units in the two other areas. The method used here to evaluate the tuning width was independent of the orientation sampling interval, in opposition to fitting methods. This is crucial when evaluating highly selective areas (Swindale et al., 2003; Bosking, 2008;

Nauhaus et al., 2008). Electrophysiological investigations by Dreher and collaborators (Burke et al., 1992; Dreher et al., 1992; Dreher et al., 1993) are at odds with our optical imaging findings as they reported broader orientation tuning functions in area 18 (full-width at half-height = 65.4 deg, SD=29.1 deg) in comparison to area 17 (49.6 +/- 17.9 deg) and 21a (52.9 +/- 27.6 deg).

Functional considerations

It is noteworthy that areas 18 and 21a present dissimilarities in their function and role, implying that these cortical regions use different mechanisms for processing visual information, and therefore have different internal organizations. According to connectivity studies (Symonds and Rosenquist, 1984a, b; Scannell et al., 1995; Hilgetag et al., 2000; Grant and Hilgetag, 2005), area 18 represents a low-level area in visual information processing, while area 21a is a high-level area. Additionally, the dorsal pathway (spatial and motion) is dominated by area 18 signals, whereas the ventral pathway (form, learning and recognition), including area 21a, is dominated by area 17 signals (Lomber, 2001). Despite the presence of directional modules in area 18 and the absence of such domains in 21a, we could not see any differences between the organization of the orientation maps in areas 18 and 21a. As a result, these maps do not necessarily reflect the differences in their neuronal computations (i.e. direction selectivity). Thus, the basic cortical structure appears to be independent of the hierarchical level or function (Koulakov and Chklovskii, 2001).

In conclusion, this study provides evidence of the contribution of area 21a in orientation selectivity but not in motion processing, supporting its position in the ventral processing stream.

REFERENCES

- Berardi N, Bisti S, Cattaneo A, Fiorentini A, Maffei L. 1982. Correlation between the preferred orientation and spatial frequency of neurones in visual areas 17 and 18 of the cat. *J Physiol.* 323:603-618.
- Bergeron A, Tardif E, Lepore F, Guillemot JP. 1998. Spatial and temporal matching of receptive field properties of binocular cells in area 19 of the cat. *Neuroscience.* 86: 121–134.
- Blakemore C, Zumbroich TJ. 1987. Stimulus selectivity and functional organization in the lateral suprasylvian visual cortex of the cat. *J Physiol (Lond).* 389:569-603.
- Bonhoeffer T, Grinvald A. 1991 Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature.* 353:429-431.
- Bonhoeffer T, Kim DS, Malonek D, Shoham D, Grinvald A. 1995. Optical imaging of the layout of functional domains in area 17 and across the area 17/18 border in cat visual cortex. *Eur J Neurosci.* 7:1973-1988.
- Bosking WH. 2008. V1 neurons: in tune with the neighbors. *Neuron.* 57:627-628. Review.
- Brosseau-Lachaine O, Faubert J, Casanova C. 2001. Functional sub-regions for optic flow processing in the posteromedial lateral suprasylvian cortex of the cat. *Cerebral Cortex.* 11:989-1001.
- Burke W, Dreher B, Michalski A, Cleland BG, Rowe MH. 1992. The effects of selective pressure block of Y-type optic nerve fibers on the receptive-field properties of cells in the striate cortex of the cat. *Visual Neuroscience.* 9:47-64.
- Casanova C, Freeman RD, Nordmann JP. 1989. Monocular and binocular response properties of cells in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *J Neurophysiol.* 62:544-557.
- Conway B, Boyd JD, Stewart TH, Matsubara JA. 2000 The projection from V1 to extrastriate area 21a: a second patchy efferent pathway colocalizes with the CO blob columns in cat visual cortex. *Cerebral Cortex.* 10:149-159
- Dreher B. 1986. Thalamocortical and corticocortical interconnections in the cat visual system: relation to the mechanisms of information processing. In: Pettigrew JD, Sanderson KJ and Levick WR, ed. *Visual Neuroscience.* p 290-314.

- Dreher B, Djavadian RL, Turlejski KJ, Wang C. 1996. Areas PMLS and 21a of cat visual cortex are not only functionally but also hodologically distinct. *Prog Brain Res.* 112:251-276.
- Dreher B, Leventhal AG, Hale PT. 1980. Geniculate input to cat visual cortex: a comparison of area 19 with areas 17 and 18. *J Neurophysiol.* 44:804-826.
- Dreher B, Michalski A, Cleland BG, Burke W. 1992. Effects of selective pressure block of Y-type optic nerve fibers on the receptive-field properties of neurons in area 18 of the visual cortex of the cat. *Visual Neuroscience.* 9:65-78.
- Dreher B, Michalski A, Ho RH, Lee CW, Burke W. 1993. Processing of form and motion in area 21a of cat visual cortex. *Visual Neuroscience.* 10:93-115.
- Dreher B, Wang C, Turlejski KJ, Djavadian RL, Burke W. 1996. Areas PMLS and 21a of cat visual cortex: two functionally distinct areas. *Cerebral Cortex.* 6:585-599.
- Dumbrava D, Faubert J, Casanova C. 2001. Global motion integration in the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Eur J Neurosci.* 13:2218-2226.
- Duysens J, Orban GA, Van Der Glass HW, Maes H. 1982a. Receptive field structure of area 19 as compared to area 17 of the cat. *Brain Res.* 231:293-308.
- Duysens J, Orban GA, Van Der Glass HW, Zegher FE. 1982b. Functional properties of area 19 as compared to area 17 of the cat. *Brain Res.* 231:279-291.
- Everson RM, Prashanth AK, Gabbay M, Knight BW, Sirovich L, Kaplan E. 1998. Representation of spatial frequency and orientation in the visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8334-8338.
- Galuske RAW, Schmidt KE, Goebel R, Lomber SG, Payne BR. 2002. The role of feedback in shaping neural representations in cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 99:17083-17088.
- Gizzi MS, Katz E, Movshon JA. 1990a. Spatial and temporal analysis by neurons in the representation of the central visual field in the cat's lateral suprasylvian visual cortex. *Visual Neuroscience.* 5:463-468.
- Gizzi MS, Katz E, Schumer RA, Movshon JA. 1990b. Selectivity for orientation and direction of motion of single neurons in cat striate and extrastriate visual cortex. *J Neurophysiol.* 63:1529-1543.

- Grant S, Hilgetag CC. 2005. Graded classes of cortical connections: quantitative analyses of laminar projections to motion areas of cat extrastriate cortex. *Eur J Neurosci.* 22:681-696.
- Hammond P. 1978. Directional tuning of complex cells in area 17 of the feline visual cortex. *J Physiol.* 285:479-481.
- Hashemi-Nezhad M, Wang C, Burke W, Dreher B. 2003. Area 21a of cat visual cortex strongly modulates neuronal activities in the superior colliculus. *J Physiol.* 15:535-552.
- Hilgetag CC, O'Neil MS, Young MP. 2000. Hierarchical organisation of macaque and cat cortical sensory systems explored with a novel network processor. *Phil Trans R Soc Lond.* 355:7-89.
- Huang L, Shou T, Chen X, Yu H, Sun C, Liang Z. 2006. Slab-like functional architecture of higher order cortical area 21a showing oblique effect of orientation preference in the cat. *Neuroimage.* 32:1365-1374.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1965 Receptive fields and functional architecture in two nonstriate visual areas (18 and 19) of the cat. *J Neurophysiol.* 28:229-289.
- Hübener M, Shoham D, Grinvald A, Bonhoeffer T. 1997. Spatial relationships among three columnar systems in cat area 17. *J Neurosci.* 17:9270-9284.
- Issa NP, Trepel C, Stryker MP. 2000. Spatial frequency maps in cat visual cortex. *J Neurosci.* 20:8504-8514.
- Issa NP, Rosenberg A, Husson TR. 2008. Models and measurements of functional maps in V1. *J Neurophysiol.* 99:2745-2754.
- Kisvarday ZF, Buzas P, Eysel UT. 2001. Calculating direction maps from intrinsic signals revealed by optical imaging. *Cerebral Cortex.* 11:636-647.
- Koulakov AA, Chklovskii DB. 2001. Orientation preference patterns in the mammalian visual cortex: A wire length minimisation approach. *Neuron.* 29:519-527.
- Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH, Wright PE. 1998. Convergence properties of the Nelder–Mead simplex method in low dimensions. *SIAM J Optim.* 9:112–147.
- Li B, Li BW, Chen Y, Wang LH, Diao YC. 2000. Response properties of PMLS and PLLS neurons to stimulated optic flow patterns. *Eur J Neurosci.* 12:1534-1544.

- Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A. 2001. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*. 412:150-157.
- Lomber SG. 2001. Behavioral cartography of visual functions in cat parietal cortex: areal and laminar dissociations. *Prog Brain Res*. 134:265-284. Review
- Lomber SG, Payne BR, Cornwell P, Long KD. 1996. Perceptual and cognitive visual functions of parietal and temporal cortices in the cat. *Cerebral Cortex*. 6:673-695. Review
- Löwel S, Freeman B, Singer W. 1987. Topographic organization of the orientation column system in large flat-mounts of the cat visual cortex: a 2-deoxyglucose study. *J Comp Neurol*. 255:401-415.
- Maffei L, Fiorentini A. 1977. Spatial frequency rows in the striate visual cortex. *Vision Res*. 17:257-264.
- Malonek D, Tootell RB, Grinvald A. 1994. Optical imaging reveals the functional architecture of neurons processing shape and motion in owl monkey area MT. *Proc R Soc Lond*. 258:109-119.
- McLoughlin, N, Blasdel GG. 1998. Wavelength-dependent differences between optically determined functional maps from macaque striate cortex. *NeuroImage* 7, 326–336.
- McLoughlin N, Schiessl I. 2006. Orientation selectivity in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): the periodicity of orientation columns in V1 and V2. *Neuroimage*. 31:76-85.
- Minville K, Casanova C. 1998. Spatial frequency processing in the posteromedial lateral suprasylvian cortex does not depend on the projections from the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Neurosciences*. 84:699-711.
- Mizobe K, Itoi M, Kaihara T, Toyama K. 1988. Neuronal responsiveness in area 21a of the cat. *Brain Res*. 438:307-310.
- Montero VM. 1981. Topography of the cortico-cortical connections from the striate cortex in the cat. *Brain Behav Evol*. 18:194-218.
- Mori A, Hanashima N, Tsuboi Y, Hiraba H, Goto N, Sumino R. 1991. Fifth somatosensory cortex (SV) representation of the whole body surface in the medial bank of the anterior suprasylvian sulcus of the cat. *Neurosci Res*. 3:198-

208.

Morley JW, Vickery RM. 1997. Spatial and temporal frequency selectivity of cells in area 21a of the cat. *J Physiol.* 501:405-413.

Movshon JA, Thompson ID, Tolhurst DJ. 1978. Spatial and temporal contrast sensitivity of neurons in areas 17 and 18 of the cat's visual cortex. *J Physiol.* 283:101-120.

Nauhaus I, Benucci A, Carandini M, Ringach DL. 2008. Neuronal selectivity and local map structure in visual cortex. *Neuron.* 57:673-679.

Payne BR. 1993. Evidence for visual cortical area homologs in cat and macaque monkey. *Cerebral Cortex.* 3:1-25.

Pigarev IN, Rodionova EI. 1998. Two visual areas located in the middle suprasylvian gyrus (cytoarchitectonic field 7) of the cat's cortex. *Neuroscience.* 85:717-732.

Raczkowski D, Rosenquist AC. 1983. Connections of the multiple visual cortical areas with the lateral posterior-pulvinar complex and adjacent thalamic nuclei in the cat. *J Neurosci.* 3:1912-1942.

Rao SC, Toth LJ, Sur M. 1997. Optically imaged maps of orientation preference in primary visual cortex of cats and ferrets. *J Comp Neurol.* 387:358-370.

Reinoso-Suárez F. 1961. *Topographischer Hirnatlas der Katze.* Darmstadt: E. Merck AG.

Rodionova EI, Revishchin AV, Pigarev IN. 2004. Distant cortical locations of the upper and lower quadrants of the visual field represented by neurons with elongated and radially oriented receptive fields *Exp Brain Res.* 158: 373-377.

Scannell JW, Blakemore C, Young MP. 1995. Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex. *J Neurosci.* 15:1463-1483. Review

Shipp S, Grant S. 1991. Organization of reciprocal connections between area 17 and the lateral suprasylvian area of cat visual cortex. *Vis Neurosci.* 6:339-355.

Shoham D, Hübener M, Schulze S, Grinvald A, Bonhoeffer T. 1997. Spatio-temporal frequency domains and their relation to cytochrome oxidase staining in cat visual cortex. *Nature.* 385:529-533.

Sirovich L, Uglesich R. 2004. The organization of orientation and spatial

- frequency in primary visual cortex Proc Natl Acad Sci U S A. 101:16941-16946.
- Skottun BC, Grosof DH, De Valois RL. 1988 Responses of simple and complex cells to random dot patterns: a quantitative comparison. J Neurophysiol. 59:1719-1735.
- Stewart TH, Boyd JD, Matsubara JA. 2000. Organization of efferent neurons in area 19: the projection to extrastriate area 21a. Brain Res. 881:47-56.
- Swindale NV. 1998. Orientation tuning curves: empirical description and estimation of parameters. Biol Cybern. 78:45-56.
- Swindale NV, Grinvald A, Shmuel A. 2003. The spatial pattern of response magnitude and selectivity for orientation and direction in cat visual cortex. Cerebral Cortex. 13:225-238.
- Symonds LL, Rosenquist AC. 1984a. Corticocortical connections among the visual areas in the cat. J Comp Neurol. 229:1-38.
- Symonds LL, Rosenquist AC. 1984b. Laminar origins of visual corticocortical connections in the cat. J Comp Neurol. 229:39-47.
- Symonds LL, Rosenquist AC, Edwards SB, Palmer LA. 1981. Projections of the pulvinar-lateral posterior complex to visual cortical areas in the cat. Neuroscience. 6:1995-2020.
- Tanaka K, Ohzawa I, Ramoa AS, Freeman RD. 1987. Receptive field properties of cells in area 19 of the cat. Exp Brain Res. 65:549-558.
- Tardif E, Bergeron A, Lepore F, Guillemot JP. 1996. Spatial and temporal frequency tuning and contrast sensitivity of single neurons in area 21a of the cat. Brain Res. 716:219-223.
- Tolhurst DJ, Thompson ID. 1982. Organization of neurons preferring similar spatial frequencies in cat striate cortex. Exp Brain Res. 48:217-227.
- Tolias AS, Keliris GA, Smirnakis SM, Logothetis NK. 2006. Neurons in macaque area V4 acquire directional tuning after adaptation to motion stimuli. Nature Neuroscience. 8:591-593
- Tootell RB, Silverman MS, De Valois RL. 1981. Spatial frequency columns in primary visual cortex. Science. 214:813-815.
- Toyama K, Mizobe K, Akase E, Kaihara T. 1994. Neuronal responsiveness in areas 19 and 21a, and the posteromedial lateral suprasylvian cortex of the cat.

Exp Brain Res. 99:289-301.

Villeneuve MY, Casanova C. 2003. On the use of isoflurane versus halothane in the study of visual response properties of single cells in the primary visual cortex. J Neurosci Methods. 129:19-31.

Villeneuve MY, Ptito M, Casanova C. 2006. Global motion integration in the postero-medial part of the lateral suprasylvian cortex in the cat. Exp Brain Res. 172:485-497.

Wang C, Dreher B. 1996. Binocular interactions and disparity coding in area 21a of cat extrastriate visual cortex. Exp Brain Res. 108:257-272.

Wimborne BM, Henry GH. 1992. Response characteristics of the cells of cortical area 21a of the cat with special reference to orientation specificity. J Physiol. 449:457-478.

ARTICLE 3a

Publié dans Journal of Neuroscience Methods 2010 May 30;189(1):138-50.

Evaluation of Receptive Field Size from Higher Harmonics in Visuotopic Mapping Using Continuous Stimulation Optical Imaging

Matthieu P. Vanni^{1,2}, Jean Provost³, Frédéric Lesage³, and Christian Casanova¹

¹Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

³ École Polytechnique de Montréal, Département de génie électrique et Institut de génie biomédical, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Christian Casanova
Laboratoire des Neurosciences de la Vision
École d'optométrie
Université de Montréal
CP 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7
Tel. (514) 343-2407
Fax. (514) 343-2382

Web: <http://www.opto.umontreal.ca/neurosciences/>

Keywords : area 17, area 18, bandwidth, cat, continuous stimulation, cortical map, Fourier, hemodynamic response, intrinsic signals, optical imaging, orientation, receptive field, visuotopy, visual cortex

Acknowledgments:

This work was supported by NSERC and CIHR grants to C.C. and a NSERC grant to F.L. FRSQ provided part of C.C.'s salary (Chercheur National program). MV was supported in part by "Foreign Affairs and International Trade" and "Faculté des études supérieures" fellowships. JP was supported by a NSERC Scholarship. We are grateful to J. Ribot for his comments on the manuscript.

Number of pages: 41

Number of figures: 10

Number of supplementary results: 11

ABSTRACT

The extraction and detection of specific responses from a large amount of background noise has been the subject of a considerable body of research in brain functional imaging, and more specifically in optical intrinsic signal imaging. Recent work has shown that by combining different conditions and periodically changing the stimuli, recording times can be reduced. Spectral decomposition is then used to provide amplitude and phase information locked to the stimulus. A drawback of the above method is that by focusing only on a single harmonic, response information is limited. The shape of the hemodynamic response function (HRF) and the temporal variations in the neural responses cannot be assessed. In this work it is argued that additional information about neural responses can be gathered by using higher harmonics. Moving bars were used to generate visuotopic maps on large portions of the cat primary visual cortex. Up to four stimuli sequences at different frequencies were superimposed in one recording session to sample the HRF in the Fourier domain. The HRF profile obtained with continuous stimulation was spatially homogeneous throughout the cortex and similar to the HRF profile obtained using episodic stimulation. Furthermore, by modeling the optical response as a convolution between HRF and neuronal responses, the ratio of the second harmonic to the first provided an estimation of the receptive field size. This was further validated by measuring the spatial frequency selectivity. Therefore, the use of higher harmonics opens new avenues to evaluate a higher number of neuronal properties from temporal signals.

INTRODUCTION

The extraction and detection of specific visual responses from a large amount of background noise remains a challenge in intrinsic optical imaging. In the literature, averaging or differential imaging methods (used in episodic paradigm). are generally used (Blasdel, 1992) and are probably the simplest means to extract neuronal maps. Averaging a number of repetitions exploits the fact that sources of physiological periodic noise (i.e., heartbeat, respiration and vasomotion) are not synchronized with the stimulation (Mayhew et al., 1996). Refinements on these analyses such as signal decomposition by principal components analysis have been subsequently developed (Everson et al., 1997; Gabbay et al., 2000). More recently, time-locked or periodic techniques which infer responses from amplitude and phase information locked to the stimulus have been explored (Sornborger et al., 2003; Sornborger et al., 2005). For example, using these principles, Kalatsky and Stryker (Kalatsky and Stryker, 2003) revealed precise visuotopic maps of the visual cortex. In contrast to the episodic technique, the continuous stimulation paradigm allows the combination of different conditions by periodically changing the stimuli recovering the spatial response by using phase information at the stimulation frequency. Experiment duration is thus considerably reduced since, as in case of visuotopic studies, an “infinite” number of stimulus positions can be presented with a high signal to noise ratio (SNR). However, the detection method considers the response elicited at only a single frequency, and consequently, for most stimuli, remains limited in terms of information content. As an example in the context of visuotopic maps described above, current periodic models fail to provide any knowledge about the size of the underlying receptive fields’ population (pRF).

In this study, techniques developed for the analyses of fMRI- images and event related diffuse optical signal (Cohen-Adad et al., 2007; Marrelec et al., 2003) are used to model periodic optical signals by introducing a canonical hemodynamic response function (HRF). We will show that, by including higher harmonics in periodic techniques, this hemodynamic model provides a mean to extract additional information from the acquired data, such as HRF profile and pRF size. Results are validated in four steps: First, the

hemodynamic model is validated with the “continuous stimulation paradigm” used to create visuotopic maps at a sub-millimeter scale of the cat primary visual cortex. Second, the linearity of the optical responses is investigated by combining multiple stimuli in one recording session. Third, multiple stimuli data is used to evaluate the profile of the hemodynamic response and compared to that obtained from episodic stimulation. Finally, harmonics are used to evaluate pRF size (i.e., second/first harmonic ratio). Part of this work has been previously published in abstract form (Vanni et al., 2007).

METHODS

Signal model

The model presented in this work is based on the periodic stacking method (Sornborger et al., 2005) and is further developed by including a model of the HRF. Although the HRF can vary between animals and spatially in the cortex, it is useful to assume at first that it is known. A discussion of how to either estimate it or the limitations of the procedure will follow. The model will then be used to estimate responses and to show how higher harmonics can be used to infer new information from the underlying signal.

For intrinsic optical imaging, a camera is positioned over the cortex to image a zone where activation patterns are expected (Bonhoeffer and Grinvald, 1996). The cortex is illuminated uniformly by light, at one or more wavelengths for which hemoglobin dominates the absorption (Dunn et al., 2005). The images are recorded continuously to form a dynamical image $I(t)$ for each illumination wavelength λ . Only one λ is modeled in this work assuming that a combination of deoxyhemoglobin (HbR) and oxyhemoglobin (HbO) is measured. For a pixel in the image, $\{ij\}$, the measured attenuation can be modeled as the sum of the stimulus response and physiological (e.g., vasomotion, respiration, heartbeat) and acquisition (e.g., generated by the camera) noises,

$$I_{ij}(t) = \alpha_{ij} HRF_{ij}(t) * R_{ij}\{s(x, y, t)\}(t) + b_{ij}(t) + e_{ij}(t), \quad (1)$$

where e_{ij} represents the acquisition noise that can be white or structured, b_{ij} describes the physiological noise at each point. The specificity of the neuronal response is defined by a period-normalized function described by the

functional $R_{ij}\{s(x,y,t)\}(t)$ (the bracket denotes the functional dependence). The functional $R_{ij}\{s(x,y,t)\}(t)$ describes the shape of the neuron response to a given stimulus $s(x,y,t)$. In the specific case of a moving bar used in this paper, the functional can be expressed as a convolution. However the notation extends to cases where the dependence is not convolutional, as would be the case with stimuli consisting of contrast changes. In the latter case, the specificity takes the form of a sigmoid function with respect to contrast. $s(x,y,t)$ represents the stimulation vector defined on the stimulus plane $\{x,y\}$, such as a computer monitor showed to the subject. α_{ij} is a real number representing the amplitude of the response. $R_{ij}\{s(x,y,t)\}(t)$ is a function of time and of the cortex spatial coordinates $\{ij\}$. Its exact form will depend on the stimulus $s(x,y,t)$, $HRF_{ij}(t)$ is the hemodynamic response function that convolves the stimuli.

Typically, stimulus-locked paradigms are designed such that their spatial extent can be entirely parameterized by a temporal variable and a stimulation frequency ω_1 . The model (1) is sufficiently general to be applied to a wide range of stimuli such as RDK, etc., (Vanni et al., 2010) However, for illustrative purposes, we will consider, throughout this paper, vertical bar stimuli. In this case, the repetition n of a vertical bar stimulus of width X centered at the position $\{x_0, y_0\}$ at $t=0$ and displayed on a screen of height H and width L can be written as a function of time alone:

$$s(x, y, t) = \text{rect}\left(\frac{\frac{L}{2\pi}(\omega_1 t + 2\pi m) - x_0}{X}\right) \text{rect}\left(\frac{y_0}{H}\right) = \text{rect}\left(\frac{\frac{L}{2\pi} \omega_1 (t - t_0 + \frac{2\pi m}{\omega_1})}{X}\right) \times 1 = s(t; \omega_1) \quad (2)$$

where t_0 is given by $x_0/L\omega_1$ and can be assumed to be zero without loss of generality. $\text{rect}((x-a)/2b)$ is a function equal to 1 in $[a-b, a+b]$ and 0 elsewhere.

When measuring the phase and amplitude of the temporal Fourier transform (denoted by the symbol $\hat{\cdot}$) of $I_{ij}(t)$ we then obtain

$$\hat{I}_{ij}(\omega) = \alpha_{ij} \hat{HRF}_{ij}(\omega) \hat{R}_{ij}\{s(t; \omega_1)\}(\omega) + \hat{b}_{ij}(\omega) + \hat{e}_{ij}(\omega) \quad (3)$$

Since the physiological noise is important only in a subset of frequencies, e.g.

vasomotion (Mayhew et al., 1996), the first term of the above expression will dominate the measured signal at ω_I if it is chosen outside this subset. Typically, the amplitude and phase of the temporal Fourier transform of the dynamic image at the stimulation frequency ω_I , $\hat{I}_{ij}(\omega_I)$, are used to generate isochrones of the cortical response. Within our model this Fourier transform is given by

$$\hat{I}_{ij}(\omega_I) = \alpha_{ij} \left| \hat{HRF}_{ij}(\omega_I) \hat{R}_{ij}\{s(t; \omega_I)\}(\omega_I) \right| e^{i\omega_I(\varphi - \tau_{ij})} \quad (4)$$

keeping in mind that this equation is valid only at frequencies away from physiological noise and where we assumed that e_{ij} was negligible. The phase of the response is composed of two components. A first component, interpreted as a delay τ_{ij} that may be different from point to point depending on stimuli. A second term, denoted by φ in the expression above, accounts for hemodynamic phases or other parameters (such as t_0) that are intrinsic to the local response. Therefore, in periodic paradigms, the phase can be exploited to identify a given activation with a stimulus state, for example spatial position.

To optimize continuous stimulation paradigms, we first note that although non-sinusoidal stimuli operate at a single frequency, their Fourier transform will contain information at other frequencies. Moreover, the Fourier transform of the HRF is non zero on a finite domain and is smooth (Ciuciu et al., 2003). Although it is expected that this function may vary among animals, cortical areas and under the influence of anesthesia, those variations have been shown to be smaller across areas than across subjects (Handwerker et al., 2004).

Response model

The objective of this section is to be more specific about the information that can be extracted from such formalism by utilizing the phase and amplitude of the measured signal at different harmonics, i.e., ω_I , $2\omega_I$, $3\omega_I$, $4\omega_I$, etc. First, a typical continuous stimulation is modeled by a periodic stimulus, such as a vertical bar moving horizontally. Previous work modeled the associated response as a sinusoidal function, and estimation methods have been used to recover its amplitude (Sornborger et al., 2003; Sornborger et al., 2005). This formalism was shown to be successful in increasing the SNR and decreasing

the acquisition time required to get neuronal maps. However more information can be extracted from the measured signal when the model used takes into account the HRF and the neuronal specificity to the stimulus. In the following, both these components will be introduced in two steps: First, an idealistic response of a neuron (or a group of neurons), perfectly specific to the preferred stimulus (e.g., the position of the vertical bar), is revisited by modeling its temporal impulse response with a Dirac distribution. Second, the approach is then generalized to a more realistic Gaussian-like response around that preferred stimulus.

An idealistic period-normalized neural response to a preferred stimulus consisting of a periodically moving bar with period $T = \omega_1/2\pi$ can be modeled by a response of infinite amplitude of the group of neuron corresponding to pixel $\{ij\}$ when the center of the bar reaches a location τ_{ij} , i.e. $t - \frac{2\pi n}{\omega_1} = \tau_{ij}$, and is zero otherwise. This can be written using a truncated Dirac comb, i.e., a sum of equally spaced Dirac delta functions,

$$R_{ij}\{s(t; \omega_1)\}(t) = \sum_{n=0}^N \delta\left(t - \frac{2\pi n}{\omega_1} - \tau_{ij}\right) \quad (5)$$

where n is the stimulus repetition index and N is the total number of stimulus periods presented (the total acquisition time can thus be expressed as NT), t is time and τ_{ij} is the time at which the neurons respond to this stimulus within the period, i.e., at which bar position they are perfectly specific. The periodic stimulation leads to harmonic components in the Fourier transform of (5) with the amplitude of the harmonic located at the stimulation frequency, ω_1 , being linearly dependant on this number of periods N (see appendix A for details):

$$\left|\hat{I}_{ij}(\omega_1)\right| = \alpha_{ij} \left|HRF_{ij}(\omega_1)\right|(N+1). \quad (6)$$

This equation simply states the fact that the longer the periodic stimulus, the higher the amplitude at the stimulus frequency will be. When this expression is combined with a simple assumption on the spectral structure of physiological noise, it can be used to optimize stimulation frequencies. While (6) focused on

the stimulation frequency, $\omega_1=2\pi/T$, the same expression can be evaluated at multiples of the stimulus frequency, $\omega_q=q\omega_1$ giving

$$|\hat{I}_{ij}(\omega_q)| = \alpha_{ij} |H\hat{R}F_{ij}(\omega_q)|(N+1). \quad (7)$$

In this expression, the ideal response (5) contributes equally in amplitude to all harmonics. However, the Fourier transform of the HRF, which decays with higher frequencies, will lead to decreasing amplitudes with increasing frequency. The only additional information contained in those harmonics is related to the HRF itself.

While the model above is instructive, modeling $R\{s(t;\omega_1)\}(t)$ by a truncated Dirac comb as above is not accurate. In the visual cortex, neurons will be selectively activated in a certain range σ_{ij} around their preferred position. This is in accordance with the concept of neuron selectivity being associated with a portion of the visual field, the receptive field (Hubel and Wiesel, 1962). Moreover, given that one pixel in the optical image represents the activity of not one but several neurons, that their receptive field position is scattered and that intrinsic optical signals comprise spiking and sub-threshold activity as well as pre- and post-synaptic signals, the response of one pixel will be considered as the response of a population of receptive fields (named pRF thereafter), (Albus, 1975; Buzas et al., 2003; Cynader et al., 1987; Das and Gilbert, 1997, 1995; Zepeda et al., 2004). The use of pRF is even more appropriate as there are “point spread” functions due to the spatial extent of the capillary blood supply (Dunn et al., 2005) and light scattering in cortex (Polimeni et al., 2005). It thus becomes reasonable to consider a Gaussian-shaped neuronal stimulus response with standard deviation σ_{ij} around a given position to model those effects. A convolution in the time domain corresponds to a multiplication in the Fourier domain and the Fourier transform of the Gaussian function is also a Gaussian function with an inversely proportional width. Thus, adding a Gaussian-shaped response modeling neuronal specificity convolved with the stimulus-driven ideal response acts as a low-pass filter altering higher frequency harmonics in the frequency domain. Explicitly, for a given pixel with a response width σ_{ij} , the modeled $\hat{R}_{ij}^G\{s(t;\omega_1)\}(\omega)$ becomes:

$$\hat{R}_{ij}^G \{s(t; \omega_1)\}(\omega) = e^{-\frac{1}{2}\omega^2\sigma_{ij}^2} \hat{R}_{ij} \{s(t; \omega_1)\}(\omega) \quad (8)$$

This additional parameter increases the model complexity but can also be used to access new information. Figure 1 summarizes heuristic expectations from this model by casting the width σ_{ij} in terms of the receptive field size (squares). Two situations are presented, in the first situation, (panel A1), the receptive field is large while in the second, (panel A2), it is small. By convolving the neural responses with the HRF, the temporal responses (row 2) and their effect in the spectral domain (row 3) for the two situations (row 1) are presented. For small receptive fields (panel A2), there is a change in the response temporal profile (panel B2) associated with an increase of the amplitude of the second harmonic which is apparent from the asymmetry created by the convolved response. The change in harmonic amplitudes is thus a signature of variations in pRF size. This signature can be exploited to quantify receptive field size.

This heuristic description above can be recast in a quantitative estimate. For example, it is possible to evaluate σ_{ij} by using the amplitude of the Fourier coefficients of the harmonics. First, as shown in (8) and (4), modeling receptive field size amounts to multiplying (6) by a Gaussian function in the frequency domain. Expressing the temporal Fourier transform $|\hat{I}_{ij}(\omega)|$ at ω_1 and $\omega_2 = 2\omega_1$ (assuming noises are negligible at both harmonics), taking the ratio ($|\hat{I}_{ij}(\omega_2=2\omega_1)|/|\hat{I}_{ij}(\omega_1)|$) and rearranging the terms, we can isolate the width parameter as

$$\sigma_{ij}^2 = \frac{2}{\omega_1^2 - \omega_2^2} \ln \left(\frac{|HRF(\omega_1)I_{ij}(\omega_2)|}{|HRF(\omega_2)I_{ij}(\omega_1)|} \right) = \frac{-2}{3\omega_1^2} \ln \left(\frac{|HRF(\omega_1)I_{ij}(2\omega_1)|}{|HRF(2\omega_1)I_{ij}(\omega_1)|} \right) \quad (9)$$

Note that in the last equation, even if there is no knowledge of the real HRF, the ratio of frequencies $|HRF(\omega_1)|/|HRF(2\omega_1)|$ can be hypothesized to be constant over the observed region of interest (ROI). Under this hypothesis, the change from one cortical location to another depends solely on the changes of the measured signal, allowing mapping this parameter or comparing surface of pRF (σ^2) between two regions A and B.

$$\sigma_A^2 - \sigma_B^2 = \frac{-2}{3\omega_1^2} \ln \left(\frac{|I_A(2\omega_1)I_B(\omega_1)|}{|I_A(\omega_1)I_B(2\omega_1)|} \right) \quad (10)$$

In expressions above, the response temporal width, σ_{ij} , is used. However, it is not a natural parameter in the brain but it is directly related to the receptive field angular width σ_{ij}' expressed as:

$$\sigma_{ij}' = \frac{\sigma_{ij}\omega_1}{2\pi\Delta\theta} \quad (11)$$

With $\Delta\theta$ describing the overall experiment angular range in the visual field leading to

$$\sigma_A^2 - \sigma_B^2 = \frac{-1}{3\pi\omega_1 \Delta\theta} \ln \left(\frac{|I_A(2\omega_1)I_B(\omega_1)|}{|I_A(\omega_1)I_B(2\omega_1)|} \right) \quad (12)$$

This last expression will be validated by comparing the results obtained with standard techniques below. The direct quantitative application of (9) is not straightforward since it requires an estimate of the HRF at both harmonic frequencies. Expression (12) however can be used without difficulty providing quantitative 2D maps of relative pRF. In the next section, the single frequency stimulation paradigm is extended to evaluate the HRF in the Fourier domain with this model.

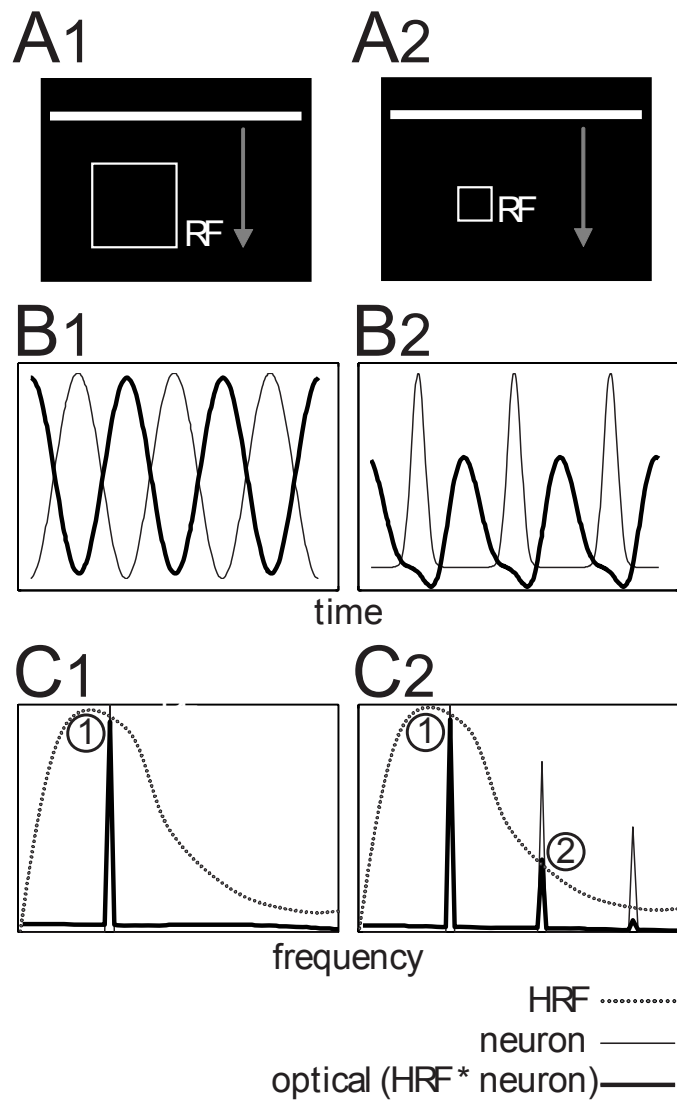


Figure 1. (A) Schematic representation of the stimuli (bars moving downward) in the visual field and receptive fields (white squares; RF). (B) Diagram of the temporal response of the neuron (thin lines) and the optical response (thick lines) which corresponds to the response of the neuronal population convolved by the HRF. (C) Schematic representation of the spectral response of the signals presented in B. The HRF envelope is represented by dotted lines. The numbers (1 and 2) represents first and second harmonics.

Hemodynamic response estimation

The formalism developed in the previous section allows the use of higher harmonics to gain insight into neuronal specificity. In this section, the feasibility of estimating the HRF with a set of harmonics is studied. Previous results have shown that it is possible to superimpose two stimuli at different frequencies and recover independently both related activity maps (Kalatsky et al., 2006). Assuming linearity and using the model above, the response for multiple stimuli is written as the sum of responses for single stimulus

$$R_{ij}^G \left\{ \sum_{k=1}^{nstim} s_k(t; \omega_k) \right\}(t) = \sum_{k=1}^{nstim} R_{ij}^G \{s_k(t; \omega_k)\}(t) \quad (13)$$

Where $nstim$ describes the number of stimuli used. Let T_k be the periods of the different stimuli, N_k be the number of periods for each type of stimulus that occur in a fixed experiment total time, T_{exp} , i.e. $N_k = T_{exp}/T_k$. By using $N_k \gg 1$ and ensuring that response components are distinguishable in order to respect the linearity condition (in other words, the ω_k 's must *not* be multiples of one another), the HRF of a pixel in the image can be sampled in the frequency domain. This is shown by observing that at a given pixel, the amplitude of the Fourier transform of (13) at the frequency of the p -th stimulus is dominated by that stimulus (see appendix A for details)

$$\left| \hat{R}_{ij}^G \left\{ \sum_{k=1}^{nstim} s_k(t; \omega_k) \right\}(\omega_p) \right| \approx e^{\frac{1}{2}\omega_p^2\sigma_p^2} (N_p + 1) \quad (14)$$

where the influence of the tails of the Gaussian functions coming from the other stimuli on the harmonics of stimulus p have been neglected. The spatial angular response described in eq. (11) is the same for all stimuli, i.e. $\omega_k\sigma_k = \omega_l\sigma_l$ for all k, l at a given pixel $\{ij\}$. Thus at the first harmonic of each stimulus frequency, $\omega_p = 2\pi/T_p$, the exponential term in (14) will have the same value, that is

$$\beta = e^{\frac{1}{2}\omega_p^2\sigma_p^2} = e^{\frac{1}{2}\omega_k^2\sigma_k^2} \quad (15)$$

The effect of the width is thus the same for each stimulus frequency and the

measured signal will be affected by the same constant β , i.e.

$$|\hat{I}_{ij}(\omega_p)| \approx \alpha_{ij} \beta |HRF(\omega_p)|(N_p + 1) \quad (16)$$

Up to this constant, dividing the signal at each frequency by (N_p+1) results in measures of the amplitude of the Fourier transform of the HRF at each ω_p . Effective sampling can be done, for instance, with multiple horizontal bars moving vertically at different speeds. However, the choice of stimulus frequencies must be done judiciously. Choosing an equispaced sampling of the frequency domain is not a good idea as explained above since the responses would be summed at multiples of the stimulation frequency. Moreover, the harmonics will be affected by the σ_{ij} 's and cannot be used to get more sampling points in this estimation without estimating $\omega_k \sigma_k$ first. An estimation of the modulus of the HRF with (16) is still possible by using a minimization process based on a parametric form of the HRF. The parametric form minimized consists of two gamma functions used to describe the delays of the response and ensuing undershoot, their dispersion as well as the ratio of the response to the undershoot. It is based on the canonical HRF originating from fMRI (from SPM2, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm2/>). While the family of curves described by the SPM parametric form may not always be adapted to optical imaging, since a combination of HbO and HbR is measured, it should be noted however that at 630nm, the wavelength used in the experiments, the extinction coefficient of HbR is 10 times larger than that of HbO₂ supporting this choice since Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) fMRI is more sensitive to HbR.

This procedure is described in appendix B and results are presented below.

Animal preparation

Six adult cats were used in this study (2.5 – 3.5 kg). All procedures were made in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals, and the experimental protocol was accepted by the Ethics committee of the University of Montreal. Throughout the experiment, the animal was placed in a stereotaxic frame and artificially ventilated with a mixture of

halothane (Fluothane®, 0.6 – 0.8 %) in O²/N²O (30% / 70%). Muscular relaxation was obtained by the continuous injection of gallaminetriethiodide (2%) infused with 5% dextrose in lactated Ringer's injection solution. End-tidal CO² level, blood pressure, blood oxygen saturation, core temperature (feed-back controlled), electroencephalogram and electrocardiogram were continuously monitored to evaluate the depth of anesthesia and adjust ventilation. Pupils were dilated with atropine sulfate 1% (Isopto®) and the eyes were protected using contact lenses of appropriate refractive power. An antibiotic (Tribissen 24%, 0.125 mL/kg/day) was injected s.c. to prevent infections. A 27 x 20mm craniotomy was performed over the primary visual cortex (areas 17, 18 and 19) at Horsley Clarke coordinates AP -10 to +17 and ML -10 to +10, and the dura was incised to access the cortex. A stainless steel imaging chamber was positioned over the craniotomy, filled with silicone oil and sealed with a glass cover slip. At the end of each experiment, the animal was killed by an intravenous overdose of pentobarbital sodium (Euthanyl, ~100 mg/kg).

Acquisition and stimulation

The cortex was illuminated at 545 nm to locate the surface vascular pattern and at 630 nm to record the intrinsic signals. Images were acquired with a 12 bits CCD camera (1M60, Dalsa, Colorado Springs, USA) fitted with a macroscopic lens (Nikon, AF Micro Nikkor, 60mm, 1:2.8D). For continuous stimulation sessions, acquisition lasted 10 to 30 min (2-8 Hz sampling frequency). Full-screen visual stimuli were generated using a custom made software and presented on a computer subtending 120 x 90 degrees of visual angle. The blind spot was back projected on the computer screen with a light source and used to determine the position of the *area centralis* (Bishop et al., 1962).

As in the paradigm described in Kalatsky and Stryker (2003), periodic activations were obtained with light bars (width of 5 deg, luminance of 50 cd/m²) moving horizontally or vertically on a dark background at frequencies varying from 0.03 to 0.5 Hz. Visuotopy and σ^2 were evaluated with one or three bars moving at a fixed frequency. The evaluation of the HRF was derived from the combination of four bars moving simultaneously but at different

frequencies. In the latter case, five sets of stimulation were recorded with distinct frequencies; first set: 0.06, 0.11, 0.15 and 0.20 Hz, second set: 0.03, 0.08, 0.13 and 0.17 Hz, third set: 0.04, 0.09, 0.15 and 0.19 Hz, fourth set: 0.07, 0.12, 0.18 and 0.21 Hz and fifth set: 0.23, 0.32, 0.42 and 0.50 Hz. To compare the data from one set to another and form an HRF independently of external conditions (e.g. anesthesia), common frequencies were chosen between pairs of experiments and used to normalize the data between sets. The rationale behind using five sets of four bars is as follows. To measure the HRF, a sufficient sampling of the frequency axis is necessary to provide substantial information about the response. However, the number of bars could not be increased much more because the stimuli may be interpreted differently by the cortex (i.e. since several bars will be simultaneously within an individual receptive field) and the linear hypothesis used would not stand.

Classical episodic protocols were used to validate different parts of the study. Spatial frequency selectivity maps were obtained from orientation maps evoked with eight spatial frequency gratings: 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.35, 0.75 and 1.0 c/deg. For each spatial frequency, vertical and horizontal orientations were presented during 8s (1.6s per frame) and spaced by 10s during which the next stationary stimulus was presented. Each of these 16 conditions was randomly presented 30 times. The episodic HRF was evoked by a 0.15 c/deg grating pseudo-randomly presented 50 times during 3s at two orthogonal orientations, preceded and followed by an equiluminant blank screen. The frame acquisition began 5s before and lasted 12s after the stimulation onset (total = 80 frames, each lasting 20s).

Offline pre-processing and episodic analysis

Data were imported into Matlab (The Mathworks, Nattick, MA) for further analysis. Signals were subtracted by a normalized temporal pattern of lighting instability to account for illumination variations. A Fourier transform was performed on the temporal signal for each pixel to obtain phase and magnitude spectra. For continuous HRF estimation, baselines of spectra, corresponding to the noise floor, were subtracted to reduce the contribution of physiological components. The comparison with the episodic HRF was done as follows: a

least-squared fit to a Gaussian mixture model containing 3 or 4 components (to describe the phases of the HRF (Chen-Bee et al., 2007), was performed on the modulus of each harmonic component. This fit was then compared to the measured episodic waveform to assess its validity. To estimate the spatial uniformity of the HRF in the cortex, a correlation analysis was done for each point between the estimated HRF (averaged over all points) and the harmonics measured at each location.

For the spatial frequency evaluation, trial responses were averaged and band-pass filtered to remove low and high frequency noise. Absolute value of the difference between activation for horizontal and vertical gratings was measured for each spatial frequency. Optimal spatial frequency was evaluated with a modified Gaussian function for each pixel as previously described in (Villeneuve et al., 2009). For the episodic HRF estimation, responses for all orientations and trials were summed and no additional processing was performed.

RESULTS

Visuotopic mapping of the visual cortex

As a first step to the analysis proposed in the previous section, we confirmed that visuotopic maps could be obtained in cats with the continuous paradigm. Figure 2 displays the raw data used to compute these maps. The temporal profile of the raw signal recorded in one location of area 18 shows a major contribution of vasomotion (large periodic fluctuations observed in panel A). A slow drift is also observed that is probably due to instrumentation (light source and camera heating). By performing the Fourier transform on this signal, different components could be discriminated: the response to the stimulus (a bright horizontal bar moving periodically through the visual field at 0.17 Hz), vasomotion waves distributed around 0.14 Hz as they are not purely periodic and respiration at 0.6 Hz (panel B). The vasomotion waves varied in amplitude, but their frequencies were always greater than 0.1 Hz. The Fourier transform also provides a phase value related to the response delays that can be used to determine the visuotopy time-delayed by the HRF. The resulting phase map (for elevation) is shown in panel B of figure 3. Since phase alone is not always

associated to a significant response, an improved representation of the visuotopy in the primary visual cortex was obtained by normalizing the phase by the signal amplitude. This is presented in panel C and in the supplementary video 1. The main part of the primary visual cortex accessible for imaging was area 18, and in particular the regions representing the central and lower parts of the visual field. A limited portion of area 17, representing the central part of the visual field, was visible in the posterior part. According to the phase transition, a drift of visuotopy along the elevation was seen in the antero-posterior axis with the lower part of the visual field represented in the anterior part of the visual cortex (panel C). Using a vertical bar, the same cortical surface was activated along the azimuth, revealing the contralateral representation of the visual field in both hemispheres (panel D and supplementary video 2). Similar results were obtained in all animals tested (see supplementary figure 1). In near half of the cases tested, a decrease of the cortical magnification factor was observed along the mediolateral axis i.e., cortical zones progressively representing the peripheral parts of the visual field along the azimuth. These visuotopic discontinuities (e.g. “patches” or “islands”) are indicated by white arrows in panel D of figure 2. A similar organization was also described by (Albus and Beckmann, 1980). Supplementary figure 2 shows the visuotopy (panels A and B) corrected by the hemodynamic delay (see Methods in Kalatsky and Stryker (2003)) and illustrates the visuotopic organization with elevation and azimuth isobars superimposed on the anatomical picture (panel C). When three bars moving at the same frequency were presented, the response amplitude was increased. In this configuration, the recording time needed to accurately map visuotopy was reduced to less than one minute (compares panels B and D and see SNR measures in panel E of supplementary figure 1). It is worth pointing out that the use of multiple bars drifted at the same frequency induces an unsolvable uncertainty about the phase locked to the visual representation and should be avoided for exact visuotopic mapping.

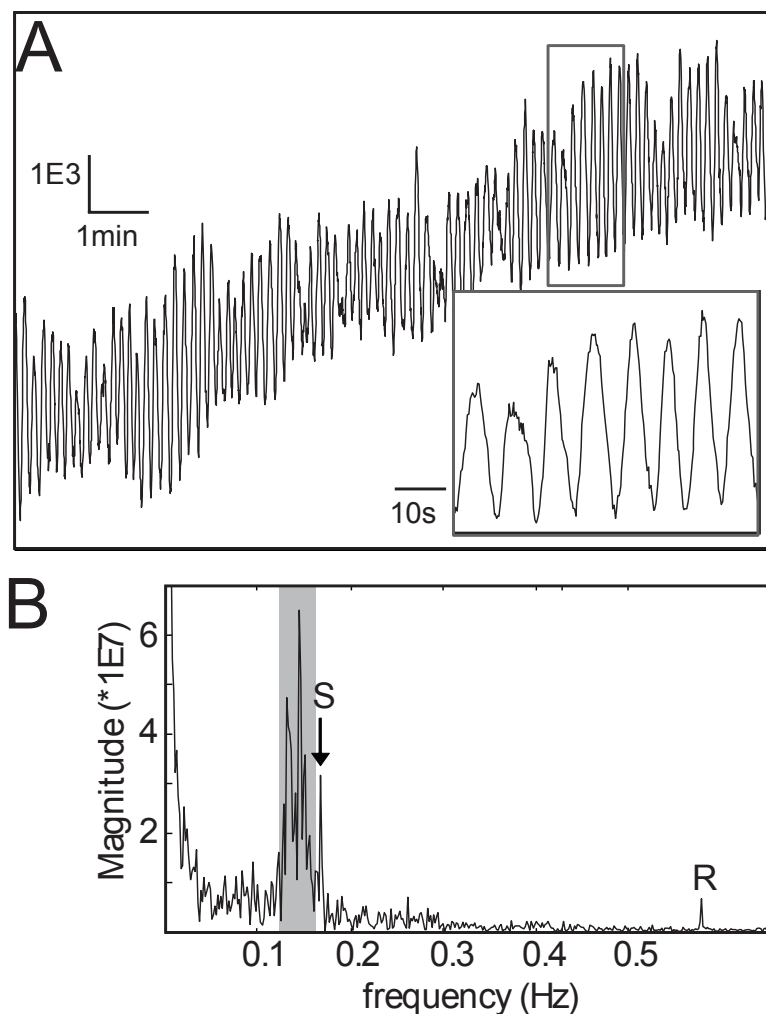


Figure 2. (A) Raw signal recorded in one location of the cortex from case 1 (corresponding to the red circle in figure 3, panel A) during a 10-min period. Note the large amplitude of the vasomotion waves. (B) Fourier transform magnitude spectrum of the signal where three components are clearly visible: stimulus (S, 0.167 Hz), vasomotion waves (approximately defined by a grey box around 0.14 Hz) and respiration (R, 0.6 Hz). In the present case, there were no signals at the second harmonic because of the stimulus frequency and pRF size, as explained in the Methods section.

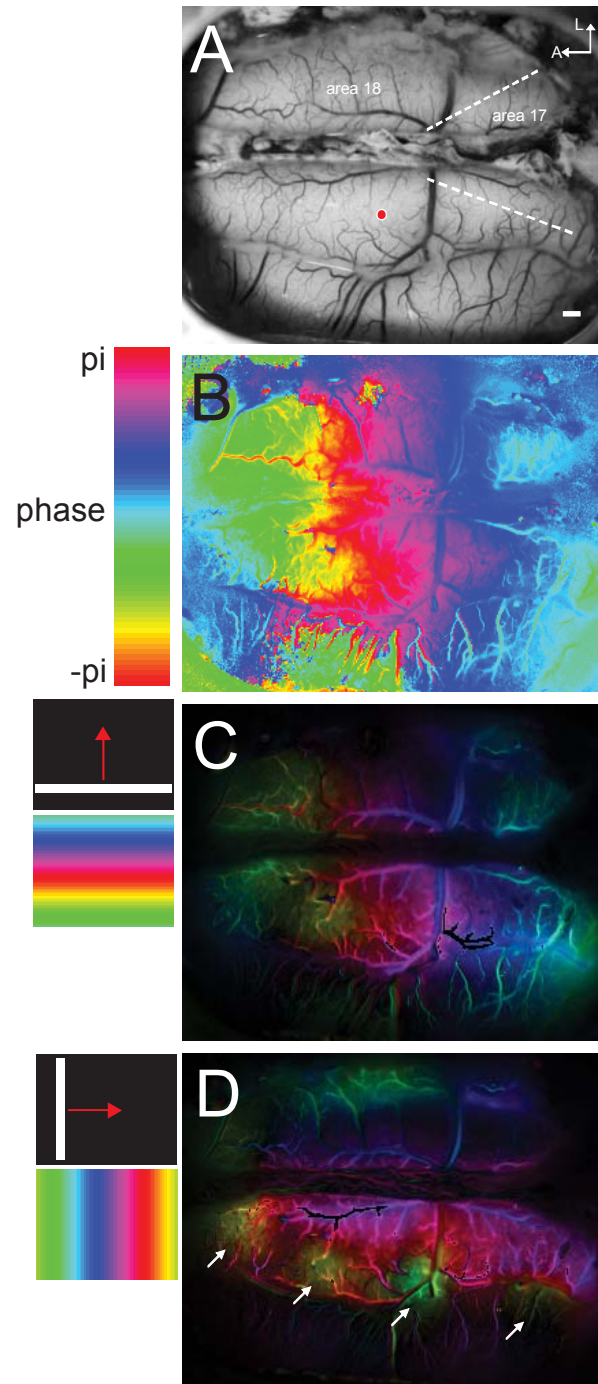


Figure 3. (A) Vasculature pattern in the ROI of the visual cortex in case 1. Borders between areas 17 and 18, based on spatial frequency maps, are indicated by dotted lines. (B) Phase map at the frequency of stimulation for a horizontal bar. (C, D) Map of the phase normalized by the magnitude for horizontal and vertical moving bars. White arrows indicate convergence to the extreme lateral parts of the visual field. Scale bar = 1mm.

HRF estimation

A refinement of the technique was made by using different frequencies of stimulation in a given recording session (Figure 4). The aim was to confirm the possibility to measure several responses simultaneously and thus, to reduce the time necessary to estimate the HRF. When two bars were drifted perpendicularly, visuotopy along azimuth and elevation could be mapped from two periodic components (panels A and supplementary video 3). Two responses were also evoked and easily discriminated when two horizontal bars moved in opposite directions (panels B and supplementary video 4). Finally, two bars moving in the same direction at different frequencies yielded comparable elevation visuotopic maps, but shifted by two distinct frequency-dependent HRF delays (panels C and supplementary video 5).

Up to four bars moving at different frequencies were successfully used to estimate HRF in the same recording session. Figure 5 displays the spectral responses to four horizontal bars moved in the same direction at different stimulus frequencies (arrows), for five distinct recording sessions (boxes 1-5). The stimulus can be appreciated in supplementary video 6. The five experiments were combined to provide 19 measures of the HRF at frequencies varying between 0.03 and 0.5 Hz (figure 6, panel A). The HRF was estimated in the frequency domain, the maximum spectral response was measured between 0.1 and 0.15 Hz and no response was observed past 0.5 Hz as previously assumed. This amplitude profile was fitted with the frequency profile of multi-Gaussian-components HRF with the method described in equation (B2) of appendix B (panel B).

Three parameters are fit for each Gaussian component in addition of a single overall offset. The best fit was obtained with a 4-Gaussian model when compared to 2- or 3- Gaussians models. As discussed in the appendix, the fit to a parameterized model is necessary since only amplitude data is used. It should be noted that with this method, the fits are valid up to a phase (temporal shift in the HRF), only the shape of the response can be fit as discussed in appendix B. An episodic protocol of HRF was measured independently to validate this periodic-based HRF estimation (panel B). A close match was observed

between episodic and periodic HRF in the spectral domain.

The spectral shape of the HRF in each pixel was correlated to the global estimate (i.e., HRF from all pixels) to provide a correlation index evaluating the homogeneity of the HRF. Panel C shows the correlation map which illustrates the similarity of the HRF across different regions of the cortex. Under large zone of equivalent illumination (e.g. comparable SNR), the correlation (i.e. homogeneity) were high and constant ($r > 0.8$) and covered the transition zone between areas 17 and 18. A similar homogeneity of the HRF was observed for a second dataset (case 4, not shown). In addition to the correlation, the ratio $|\text{HRF}(\omega_1)|/|\text{HRF}(2\omega_1)|$ appearing in (9) was calculated (supplementary figure 3). These ratios showed that there was a high degree of homogeneity on a large portion of the cortex in two cases both with periodic (panels A and B) and episodic paradigms (panel C and D). All these results clearly indicate that the HRF is homogeneous in the cat primary visual cortex and that the ratio of the second to the first harmonic can be used to directly evaluate maps of pRF (see (12) in the model). It should be noted that this validation is academic in nature since the amount of time and number of experiments necessary to evaluate the HRF in continuous stimulation is much larger than with episodic paradigms. However, the good correspondence with the episodic waveform confirms that the episodic HRF can be used to calibrate continuous stimulation measures.

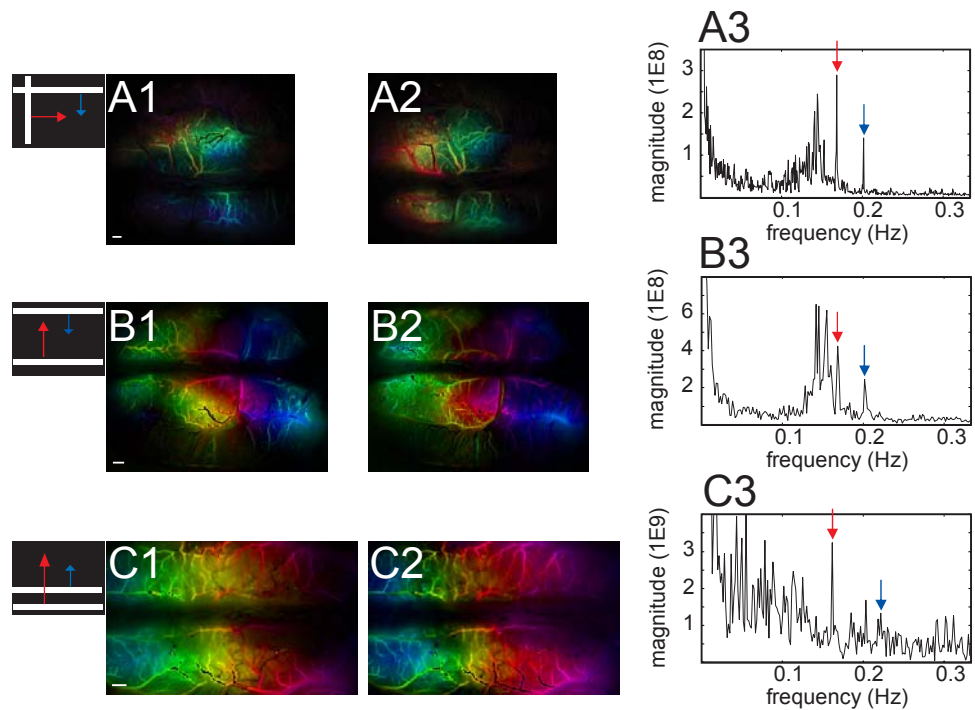


Figure 4. Relative maps along (A1) the azimuth and (A2) elevation obtained in the same recording session from case 2. The stimulus consisted of two perpendicular bars moving at two frequencies (0.167 and 0.2 Hz). (A3) Magnitude spectrum with responses identified by arrows. (B) Relative maps along elevation obtained in the same recording session from case 1 with two parallel bars moving up- and downward at two frequencies (0.167 and 0.2 Hz). (C) Relative maps along elevation obtained by 2 bars moving upward at two frequencies in the same recording session (0.16 and 0.22 Hz, case 3). Note that the phases were aligned in panels B and C for clarity. Scale bar = 1mm.

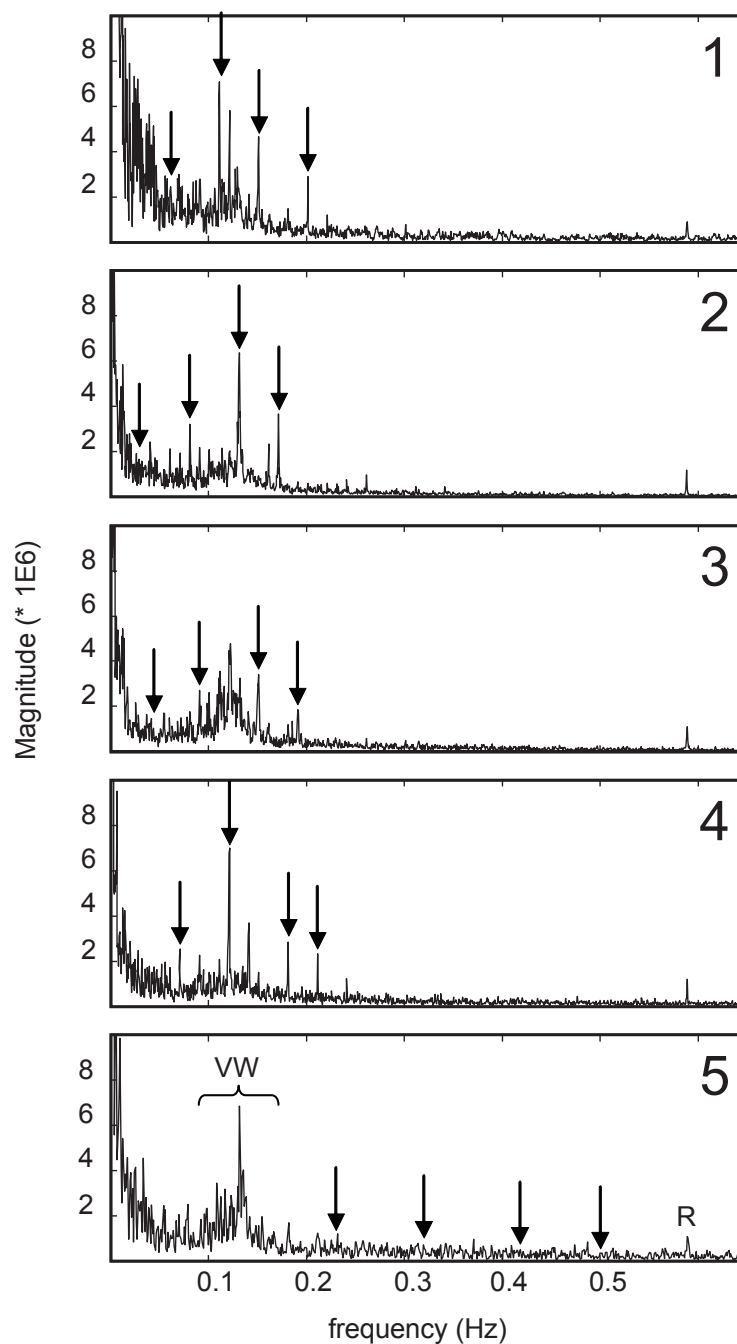


Figure 5. Magnitude spectrum in five recordings from case 3 following stimulation with a set of 4 bars moving at 4 different frequencies indicated by the black arrows: recording 1 (0.06, 0.11, 0.15 and 0.2 Hz), recording 2 (0.03, 0.08, 0.13 and 0.17 Hz), recording 3 (0.04, 0.09, 0.15 and 0.19), recording 4 (0.07, 0.12, 0.18 and 0.21) and recording 5 (0.23, 0.32, 0.42 and 0.50). Recording time was 30 min in 1-4 and 18 min in 5. These data correspond to the average signal magnitude of all pixels on the cortical region presented in figure 6C.

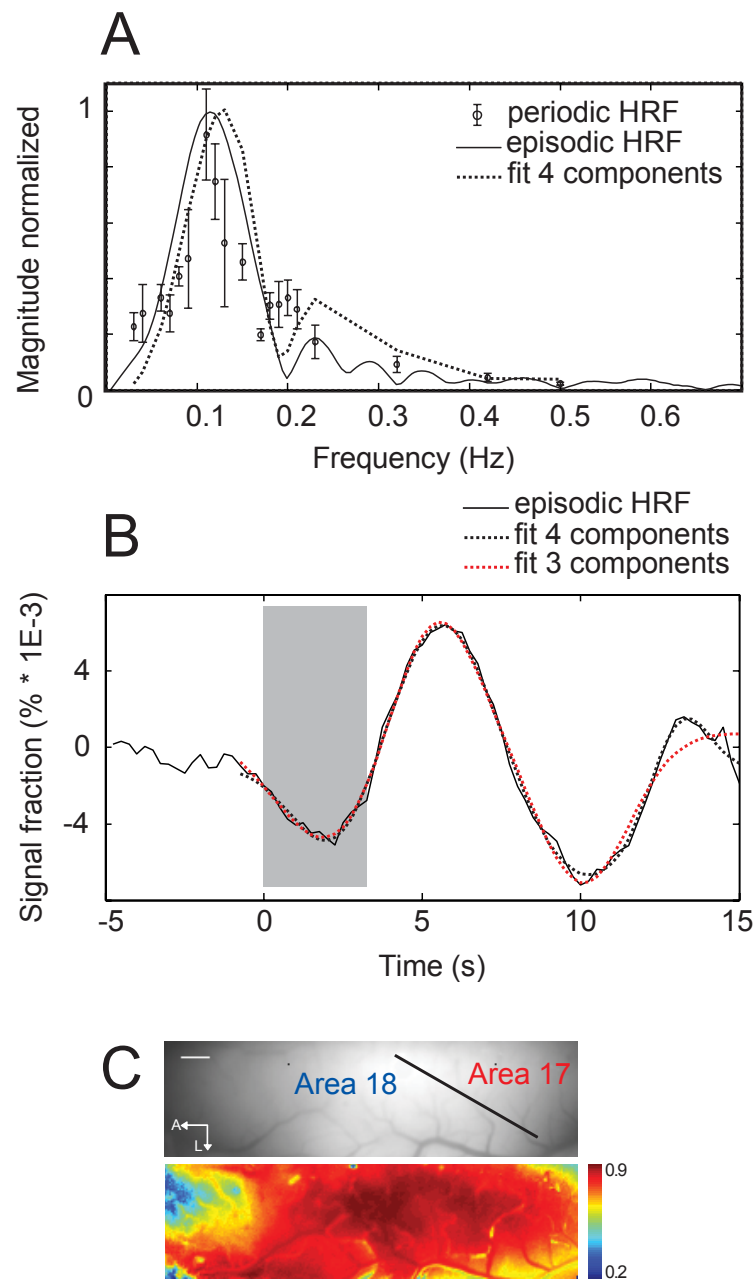


Figure 6. (A) Mean and standard deviation of the normalized response (circles, obtained from figure 5), fitted by 4 Gaussian canonical HRF models (dashed line), and compared with the Fourier transform of an episodic HRF (continuous line). (B) Episodic HRF (black line) and canonical HRF model constituted by 3 Gaussians (red dashed line) and 4 Gaussians (black dashed line). (C) HRF correlation across the imaged cortex.

pRF estimation

The main goal of the study was to demonstrate that our proposed model can be used to estimate the receptive field size of the underlying population of neurons. As mentioned above, the simple estimation of the first harmonic does not provide information about the shape of the response. Additional knowledge can be gathered however by using a ratio of the second harmonic relative to the first when the HRF is considered constant throughout the cortex, which was demonstrated above. Panel B in figure 7 illustrates the responses at both first and second harmonics to horizontal bars moving at various frequencies (0.05 to 0.333Hz) in areas 17 and 18 (panel A). Due to the frequency dependence of the HRF (see above), the magnitude was maximum at 0.111 Hz for the first harmonic and at 0.1 Hz (stimulus frequency = 0.05 Hz) for the second, independently of the cortical location. Panel C shows the ratio of the second harmonic relative to the first, a measure that is inversely related to the pRF (see (9) in the model); for low stimulus frequencies, this ratio was always higher in the posterior part of the cortex (area 17). Figure 8 illustrates the spectra and magnitude averages in the two regions of interest shown in red and blue boxes in figure 7C. The spectrum of the response in areas 17 (panel A) and 18 (panel B) confirmed the previous observation that the second harmonic became smaller when the stimulus frequency increased and that the second to first harmonic ratio was always stronger in area 17 than in area 18. The previous data can also be presented as a function of stimulus frequency. Panel A of figure 9 clearly shows that the ratio was all the time higher in area 17 and was always greater for low stimulus frequencies, irrespective of the area considered. All these results could be reproduced over time (compared values in panels A and B obtained one day apart in the same cat) and across animals (panel C).

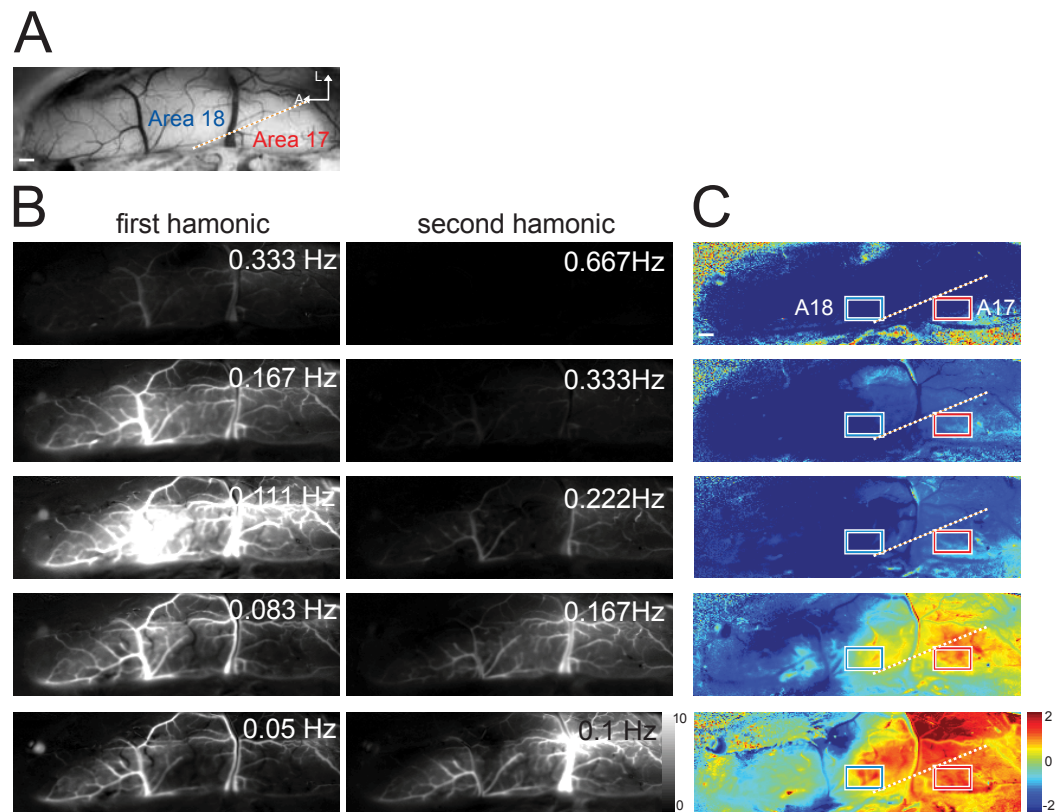


Figure 7. (A) Vasculature pattern in the ROI of case 4. (B) Magnitude maps of the response for an upward bar at the first and second harmonics for 5 stimulus frequencies: 0.333, 0.2, 0.167, 0.083 and 0.05 Hz (i.e. 1/3s, 1/6s, 1/9s, 1/12s and 1/20s). (C) Maps of the second to the first harmonic ratio for the 5 frequencies used in B. Dotted lines indicate the approximate delimitation between areas 17 and 18. Scale bar = 1mm.

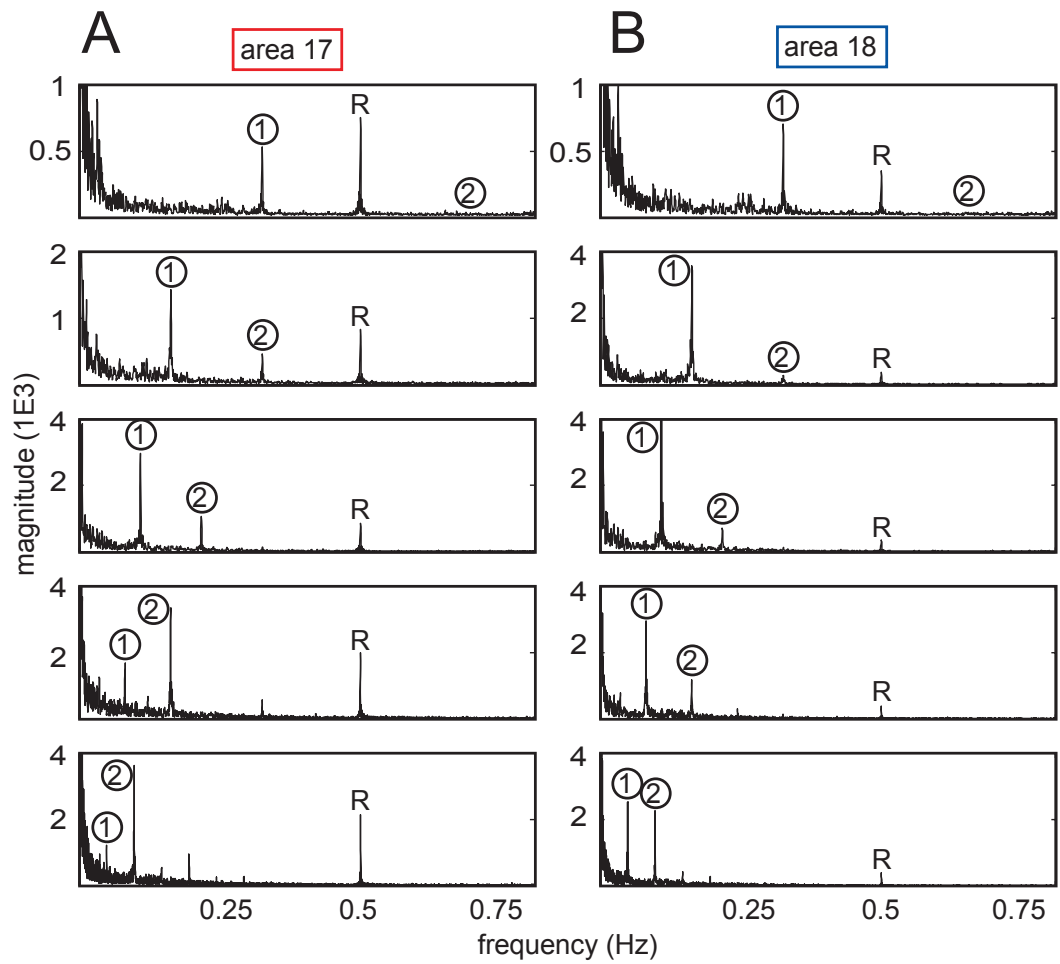


Figure 8. Magnitude spectrum in the two ROIs indicated in figure 7C (red and blue squares for areas 17 and 18).

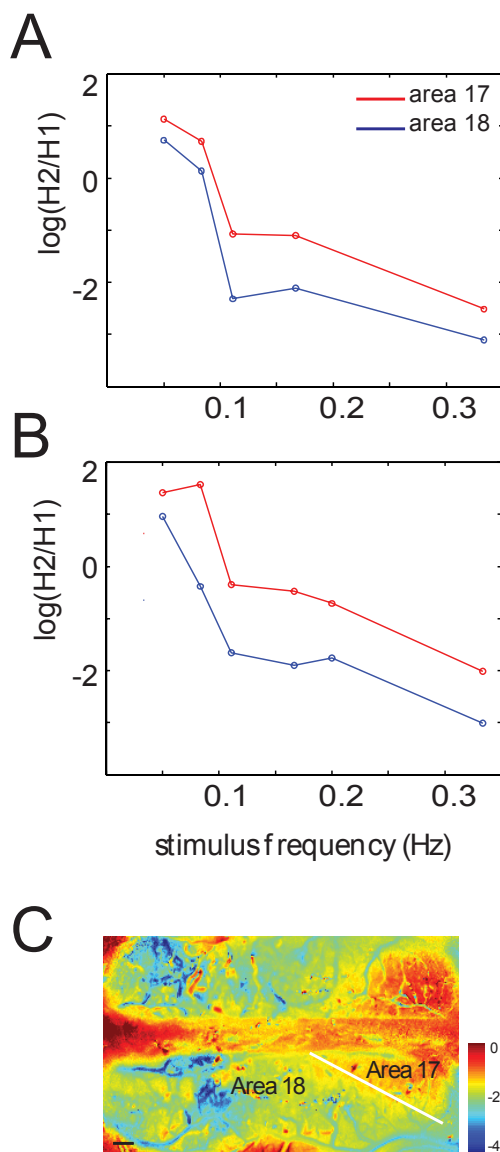


Figure 9. (A) Ratio of the second to the first harmonic in the two ROIs indicated in Fig 7C as a function of the 5 stimulus frequencies. (B) Data from another experiment carried out one day later in the same animal (case 4) shows the stability of the measures. (C) Maps of the second to first harmonic ratios at 0.167 Hz obtained in another animal (case 3). Scale bar = 1mm.

To validate the relation between the second to first harmonic ratio and the pRF, the former was compared with the spatial frequency selectivity map. The underlying assumption was that spatial frequency is related to the pRF size. To obtain spatial frequency selectivity maps, orientation maps corresponding to the difference of activation between vertical and horizontal gratings were acquired at eight spatial frequencies (supplementary figure 4, panel A). Activations were maximal at 0.35 and 0.15 c/deg in areas 17 and 18, respectively. The absolute values displayed at the pixel level in each area show that a high degree of spatial frequency selectivity can be measured by optical imaging (supplementary figure 4, panel B). Panel A4 of figure 10 shows the resulting map in which the spatial frequency which evoked the strongest response (i.e., optimal spatial frequency) was measured for each pixel. Mapping spatial frequency from two differential orientation maps will necessarily lead to incomplete spatial frequency maps. Since oblique orientation domains were not activated, a number of pixels did not display a spatial frequency tuning, increasing noise level in the spatial frequency map. Panel A2 displays the spatial frequency normalized by the amplitude, which allows accurate spatial frequency measurements in activated orientation domains (e.g. cardinal orientations). Note however that this partial spatial frequency coverage does not allow corroborating (or not) the presence of spatial frequency maps as those shown by (Issa et al., 2000). Optimal spatial frequency was 0.3 – 0.5 c/deg in area 17 and 0.1 – 0.2 c/deg in area 18. These values are comparable to those previously obtained by electrophysiological ((Movshon et al., 1978): A17 (median) = 0.7, A18 = 0.18), and optical imaging means (Issa et al., 2000: A17 (median) = 0.53, A18 = 0.18). The differences between area 17 values are likely to come from pixels located in the Transition Zone between areas 17 and 18, which can exhibit “mixed” properties of both areas.

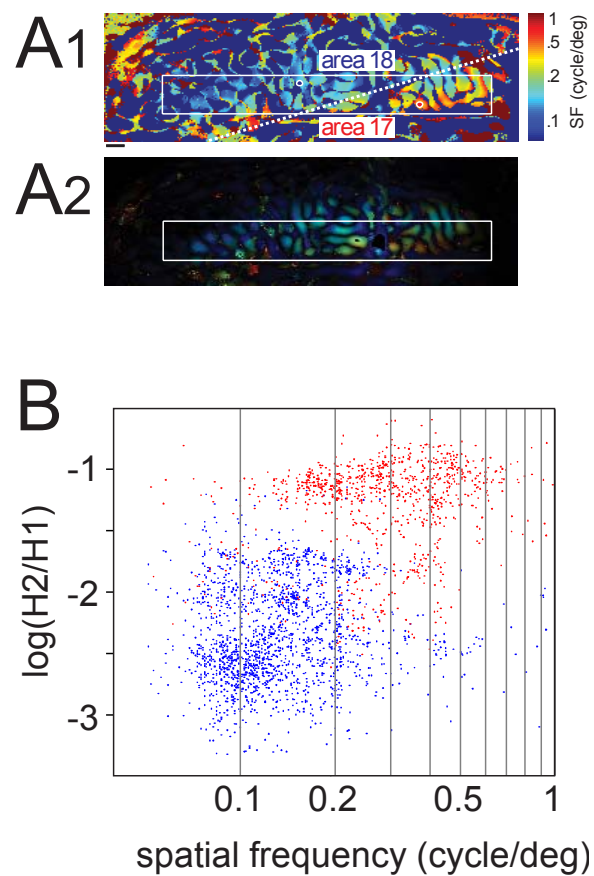


Figure 10. (A) Optimal spatial frequency map from case 4 (panel 1: spatial frequency alone; panel 2: normalized by amplitude). The white rectangle indicates the ROI of the scatter plot made in (B). The dotted line indicates the border between areas 17 and 18 based on the transition of optimal spatial frequency. (B) Correlation between the spatial frequency and the ratio shown in figure 7-C (0.167 Hz). Red and blue dots indicate band-pass pixels from areas 17 and 18, respectively (as delimited in panel A). Scale bar = 1mm.

The relation between optimal spatial frequencies (map in panel A) and the ratio of the second harmonic to the first (map at 0.167 Hz in panel C of figure 7) is shown for each pixel in panel B. A positive relation between spatial frequency and harmonic ratio could be observed: high optimal spatial frequency in area 17 was associated with high ratio, meaning small pRF in our model. In contrast, in area 18, low optimal frequencies were associated with low ratios, meaning large pRFs. This positive correlation was also observed with ratio associated to other stimulus frequencies (0.05 to 0.167 Hz, supplementary figure 5).

Given that the HRF is equally distributed throughout the cortex, the quantification of ratio of second / first harmonic allowed to successfully compare the pRF size between two area by using (12). This new measure can yield significant benefits in visual pathology situations as it can be used to quantify the effect of experimental manipulations on the pRF size. Although this relative quantification was robust, the quantification of individual values of pRF in one area through (9) was more challenging (data not shown) mainly due to baseline noise. Further work is being done to address those difficulties.

DISCUSSION

This study showed that the “continuous stimulation paradigm” developed by Kalatsky and Stryker (2003), can be successfully used to acquire visuotopic maps along the azimuth and elevation using vertical and horizontal bright bars in the cat primary visual cortex, with reduced acquisition time. More important perhaps is the evidence that, in the same recording session, up to four stimuli presented at different frequencies can be combined to evaluate the profile of the HRF. The latter was homogeneous throughout the cortex allowing the relative estimation of the pRF size between two areas by simply computing the ratio of the second to the first harmonic. Our model shown that this ratio was inversely proportional to the pRF size and was found to be stronger in area 17 than 18. Spatial frequency was used to validate this measure and confirmed that high ratio pixels are associated with high spatial frequencies.

Visuotopic mapping by single harmonic analysis

While the episodic method has been successfully used to acquire visuotopic maps in rodents and tree shrews (Bosking et al., 2002; Bosking et al., 2000; Gias et al., 2005; Schuett et al., 2002; Van Hooser et al., 2005), limitations of this paradigm include coarse definition of the maps and long recording sessions. The recently developed continuous stimulation paradigm was, until now, essentially applied to rodent models (Cang et al., 2005a; Cang et al., 2005b; Kalatsky and Stryker, 2003). In the present study, we demonstrated that this method is suitable for high-resolution visuotopic mapping of the cat cortex. The rationale behind the present work was the observation that, while continuous visuotopic signals can be obtained rapidly, these signals provide rather limited information. Here, higher harmonics were used for the first time to evaluate the HRF and the pRF size. This yielded the acquisition of maps with a resolution at the sub-millimeter scale. The general organization of the visuotopic maps obtained in this study was comparable to those previously reported using other approaches such as electrophysiological mapping (Albus and Beckmann, 1980; Olman et al., 2003; Tusa and Palmer, 1980; Tusa et al., 1979). A clear continuous organization of elevation was systematically observed on the primary visual cortex, mainly comprising the lower visual field representation in area 18. A continuous organization of the azimuth was also observed.

The use of horizontal or vertical oriented moving bars in animals with a cortical columnar organization for orientation raises the question of the homogeneity of activation. One could have expected to observe patches of activities within the visuotopic maps. This was not the case, suggesting that optical imaging responses to bars were dominated by non oriented signals. Similarly, no evidence of modular organization for ocular dominance was seen in area 17 despite the fact that the stimuli were presented monocularly.

Hemodynamic response and noise

Combining continuous recording with spectral decomposition represents a powerful method since noise can be easily discriminated from the raw signal because of its periodicity, e.g. around 3 Hz for heartbeat (generally filtered),

0.5 Hz for respiration and 0.1 Hz for vasomotion. In our experiments, a major noise contribution originated from vasomotion which correspond to slow pulsations of oxygenated blood in the capillaries of anesthetized and awake animals. These waves emerged from various loci in the cortex and had a frequency slightly greater than those reported in previous studies in the same species (0.12 to 0.14 Hz against 0.1 Hz or less in (Kalatsky and Stryker, 2003; Mayhew et al., 1996)). The contribution of vasomotion noise was reduced by adjusting the stimulus frequencies to values away from the noise frequencies.

By choosing different stimulus frequencies, we assumed that the optical response is additive for independent stimuli and therefore extracted the distinct responses in the same recording session (Kalatsky et al., 2006). With this assumption, multiple visuotopic maps were acquired simultaneously in a single recording session. This paradigm was exploited to measure the HRF frequency response by blending different frequencies in a session. A close relationship was observed between the HRF derived from continuous and episodic protocols in both time and frequency domains despite the fact that the stimuli were different (bars and sine wave gratings). The HRF had its maximum value around the same frequency as vasomotion and was homogeneous in a large portion of the cortex, independently of the visual area considered or the density of the vasculature (but see (Harrison et al., 2002)). The few non-homogeneities observed could be attributed to a non-uniform illumination level yielding then different SNRs.

The HRF evaluation was based on a number of assumptions. Several factors could have yielded a misevaluation of this measure: the number of bars, their speed and frequency. In our approach, we assumed that the velocities used (0.03 to 0.5 Hz corresponding to 2.7 to 45 deg/s) did not influenced the neuronal responses, which is an incorrect statement if one considers the bulk of electrophysiological data on this matter. In particular, when several bars were presented, the neuronal response to the highest frequencies (0.2 – 0.5 Hz) can be reduced, displacing the HRF estimate to lower frequency. This last observation may explain, in part, that the quantification of individual values of pRF was not achieved from (9). However, the normalization with common

frequencies chosen between pairs of experiments performed in our five sets of multiple stimulations reduced the impact of the detrimental effects observed at high frequency stimulations. Thus, in our paradigms, velocity and frequency appear not to be critical. The maximum value of the HRF was around 0.1 Hz (10 deg/s), in agreement with episodic measures, and no differences in the HRF profile were observed along the transition from area 18 to 17, where neurons are tuned to slower velocities. It is also noticeable that the ratio $|HRF(\omega_1)|/|HRF(2\omega_1)|$ was always homogeneous throughout the cortex in a large range of frequencies (0.05 – 0.33 Hz). It thus can be concluded that speed selectivity played a minor role in HRF profiles.

Finally, as expected, the HRF did not carry neuronal information beyond 0.5 Hz; thus continuous stimulation applied to intrinsic signals cannot be used for stimulation periods shorter than 2s.

Response bandwidth by multiple harmonics analysis

According to the model, the ratio of the second to the first harmonic carries information about the profile of the neuronal response. The multiple harmonics analysis was used to evaluate the relative size of the pRF. For each stimulus frequency tested, the ratio was always larger in area 17 than in 18. Further, this ratio was greater in parts of area 18 representing the peripheral visual field where receptive fields are known to be larger in size. Similar observations were reported in human fMRI studies, with the comparable periodic paradigm (Engel et al., 1994; Tootell et al., 1997). These authors did not spectrally decompose the signal the same way as we did. Nevertheless, they noted a different time course between areas V1 and V3, supporting the presence of different receptive field sizes in those areas. Based on this observation, a recent approach was proposed by (Dumoulin and Wandell, 2008) who estimated the pRF size in each voxel by a linear spatio-temporal model of the fMRI response. As in the present study, the pRF was modeled by a Gaussian function and the neuronal response was convolved by the HRF. This method gives an absolute estimation of the pRF but assumes that the contribution of physiological noise must be minimal in order to fit the data with the model. This is not the case in optical imaging (see the dominant contribution of noise in figure 2). The

method proposed in this work has the advantage of being independent of the noise model chosen and straightforward in its application.

The quantification of the ratio *per se* did not allow a direct quantification of the pRF size. Indeed, if one considers only a Gaussian neuronal response without any HRF, the ratio should be constant for any frequency of stimulation. But, as shown in the model, the multiplication of the HRF in the frequency space (i.e., temporal convolution of the signal by the HRF) modified the ratio as a function of the stimulus frequency. The HRF profile is such that the second harmonic contribution is inversely proportional to the stimulus frequency. Thus, to estimate the ratio, the frequency of stimulation should be reduced while the number of repetitions should be maximized, avoiding the physiological sources of noise. At low stimulus frequency (0.05 Hz), third and fourth harmonics were also observed and one could envision using these additional components for quantifying neuronal response profiles. Finally, one should keep in mind that, as described in the model, relative or absolute estimation of pRF is not equivalent to a direct quantification of individual receptive field size. Thus, the pRF variation can be due, in part, to a difference in position variance of receptive fields between areas (Dumoulin et al., 2008).

The relevance of the ratio as an indirect measure of the pRF size has been validated by measuring spatial frequency tuning for each pixel. As such, a positive correlation between the ratio and the spatial frequency was found in the primary visual cortex (in both areas 17 and 18). It should be kept in mind that when using a flat screen, a bar presented in the periphery of the visual field appears to move slower, yielding an overestimation of the pRF. This effect can be particularly significant for eccentricities greater than 30 degrees, but would be less pronounced in cats than rodents which have a larger monocular field of view. Another source of uncertainty could come from the fact that neurons with similar optimal spatial frequencies may have different receptive field sizes, reducing then the correlation between optimal spatial frequency and pRF estimate.

A five degrees width bar was used to successfully image and evaluate the pRF size in areas 17 and 18. This width value closely matches receptive field size in area 18 but is greater than that reported in area 17 (Albus and Beckmann, 1980; Olman et al., 2003; Tusa et al., 1978; Tusa et al., 1979). However, as previously described, due to the “point spread” response in optical imaging, the response at each pixel is more associated to the pRF, which covers a larger spatial area than an individual receptive field. We then assumed that the width of the bars was always smaller than the pRF and consequently that it did not notably interfere with the evaluation of the latter.

Conclusion and future directions

Using continuous stimulation, clear visuotopic maps of the cat primary visual cortex were acquired in a short recording period and responses to mixed stimuli were simultaneously recorded in a given test. More important perhaps, the analysis of higher harmonics was exploited to estimate the receptive fields’ size of the underlying neurons. This measurement represents a new tool that will likely be valuable in projects requiring a thorough quantification of cortical organization (e.g. developmental studies, impact of experimental manipulations on functional maps).

The study presents a new approach to measure the shape of a response (i.e. the bandwidth of the Gaussian model of the receptive field). This approach can be easily exported to parameters other than receptive field size, and that, for any moving stimulus (e.g., wedge or ring as those used in fMRI). A particular example would be the evaluation of orientation tuning bandwidth in response to rotating grating (as used in (Kalatsky and Stryker, 2003), see fig 2G-H and 8, (Vanni et al., 2009)). It will also be very useful in other optical imaging approaches such as those based on flavoprotein autofluorescence and voltage sensitive dyes (Husson et al., 2007). It would as well be beneficial in studies investigating other sensory systems (e.g., tonotopic bandwidth in the auditory cortex, (Kalatsky et al., 2005)). Finally, the bandwidth estimation could also be exploited in human imaging modalities such as fMRI or diffuse optical imaging given the similar nature of the signals recorded.

Appendix A

In this appendix, details are provided on the academic model of perfectly specific neurons. Consider a group of neurons that reacts only when a horizontal bar is located at a very precise position on a screen, i.e. having a very small receptive field. In this case, $R\{s(t)\}$ can be modeled as a Dirac distribution located on that position. The bar will pass through that point N times, N being the number of periods of the stimulation. Each of these occurrences can be related to a particular time $\tau_{ij} + nT$ in the experiment, where τ_{ij} is the first time when the response occurs within the period and nT is the n^{th} period of the stimulus. The index $\{ij\}$ indicates quantities that are specific to a pixel (therefore to a group of neurons). The idealistic period-normalized neural response to a preferred stimulus can be modeled by

$$R_{ij}\{s(t; \omega_1)\}(t) = \sum_{n=0}^N \delta(t - nT - \tau_{ij}) = \sum_{n=0}^N \delta\left(t - \frac{2\pi}{\omega_1} n - \tau_{ij}\right) \quad (\text{A1})$$

where $\omega_1 = 2\pi/T$ is the angular frequency (rad/s) of the stimulus. By taking the Fourier transform:

$$\begin{aligned} \hat{R}_{ij}\{s(t; \omega_1)\}(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{i\omega t} \sum_{n=0}^N \delta\left(t - \frac{2\pi}{\omega_1} n - \tau_{ij}\right) dt = \sum_{n=0}^N e^{-i\omega\left(\frac{2\pi}{\omega_1} n + \tau_{ij}\right)} \\ &= -e^{-i\omega\tau_{ij}} \frac{\left(1 - e^{-i\omega\left(\frac{2\pi}{\omega_1}(N+1)\right)}\right)}{\left(1 - e^{-i\omega\left(\frac{2\pi}{\omega_1}\right)}\right)} \\ &= e^{-i\omega\tau_{ij}} e^{-i\pi\frac{\omega}{\omega_1} N} \frac{\sin\left[\frac{\omega}{\omega_1} \pi(N+1)\right]}{\sin\left[\frac{\omega}{\omega_1} \pi\right]} \end{aligned} \quad (\text{A2})$$

where the geometric progression was used to get the last line. In continuous stimulation, the frequency of interest is $\omega = \omega_1$ and, neglecting the noises in (1) assuming a small spectral width, the measured response can be identified in the Fourier domain by a simple product of the HRF and the response R_{ij} at the

frequency of stimulation. By using l'Hôpital's rule on (A2), the strength of the harmonic located at ω_1 , the stimulation frequency, is seen to be linearly dependant on N:

$$\hat{R}_{ij} \{s(t; \omega_1)\}(\omega_1) = (-1)^N e^{-i\omega_1 \tau_{ij}} (N+1) \quad (\text{A3})$$

This can be extended to the case of more than one (two in this example) periodic stimulus of angular frequencies ω_1 and ω_2 respectively, by assuming linearity, we have for experiment time $2\pi N/\omega_1$:

$$R_{ij} \left\{ \sum_{k=1}^{nstim} s_k(t, \omega_k) \right\} (t) = A \sum_{n=0}^N \delta(t - t_n - \tau^{(1)}_{ij}) + B \sum_{k=0}^M \delta(t - t_k - \tau^{(2)}_{ij}) + \dots \quad (\text{A4})$$

Where $(2\pi M/\omega_2) < (2\pi N/\omega_1)$, since the stimuli are considered to not be multiples of each other, the remainder containing the response for the partial presentation of stimulus with amplitude B. In the following this is described by an $O(1)$ term (compared to $O(N)$ and $O(M)$ terms). The Fourier transform for fixed experiment time yields:

$$\begin{aligned} \hat{R}_{ij} \left\{ \sum_{k=1}^{nstim} s_k(t, \omega_k) \right\} (\omega) &= A e^{-i\omega \tau_{ij}^{(1)}} e^{-i\pi \frac{\omega}{\omega_1} N} \frac{\sin \left[\frac{\omega}{\omega_1} \pi (N+1) \right]}{\sin \left[\frac{\omega}{\omega_1} \pi \right]} + \\ &A e^{-i\omega \tau_{ij}^{(2)}} e^{-i\pi \frac{\omega}{\omega_2} N} \frac{\sin \left[\frac{\omega}{\omega_2} \pi (M+1) \right]}{\sin \left[\frac{\omega}{\omega_2} \pi \right]} + O(1) + \dots \end{aligned} \quad (\text{A5})$$

Applying l'Hôpital's rule at either $\omega = \omega_1$ or $\omega = \omega_2$ (or any n) will yield equations (13).

Appendix B

Since only amplitude data is used for the recovery of the HRF, a parametrized model of the HRF is built by introducing N Gaussian components:

$$h(\alpha, a_i, b_i, c_i; t) = \alpha + \sum_{k=1}^N a_i \exp\left(-\frac{(t-b_k)^2}{2c_k^2}\right) \quad (\text{B1})$$

To describe each component, three parameters are needed in addition to an overall parameter, α , describing a data offset. By Fourier transforming this functional form and evaluating the modulus of the Fourier transform at experimental frequencies, ω_k , it is possible to minimize the least square distance between the parametrized form and the experimental data:

$$\Omega = \sum_k \left(\left| \widehat{HRF}(\omega_k) \right| - \left| h(\alpha, a_i, b_i, c_i; \omega_k) \right| \right)^2 \quad (\text{B2})$$

Since absolute values are used, this minimization does not completely determine the model. If all b_k are shifted by a constant, δ , then the Fourier transform of the sum (B1) will be modified by a pure phase at each frequency and this change will be invisible in the minimization problem (B2). This shift amounts to an overall translation in time thus the estimation presented in the results cannot recover this overall shift. However if a single Gaussian function in the sum (B1) is temporally shifted, the modulus at the experimental frequencies will be modified since the absolute value of the sum is used in the Fourier domain (and not the sum of the absolute values). Thus the relation between the different terms, or the shape of the HRF, can be recovered by using three or four Gaussian components as shown in the results.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary video 1. Video of the stimulus used in figures 2 and 3, panels B and C and corresponding cortical activation. The frames of the video correspond to the sum of the responses evoked by the 100 repetitions of the moving bars.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-15/4852/html/S0165027010001470/dc0220a4e72ba3af8c4e20a64785dc6c/mm c2.mpg>

Supplementary video 2. Video of the stimulus used in figure 3, panel D and corresponding cortical activation.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-16/4852/html/S0165027010001470/91319c947545478f382f676155d1ad7b/m mc3.mpg>

Supplementary video 3. Video of the stimulus used in figure 4, panel A.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-17/4852/html/S0165027010001470/894600f6307e3cc93b353987446db32b/m mc4.mpg>

Supplementary video 4. Video of the stimulus used in figure 4, panel B.

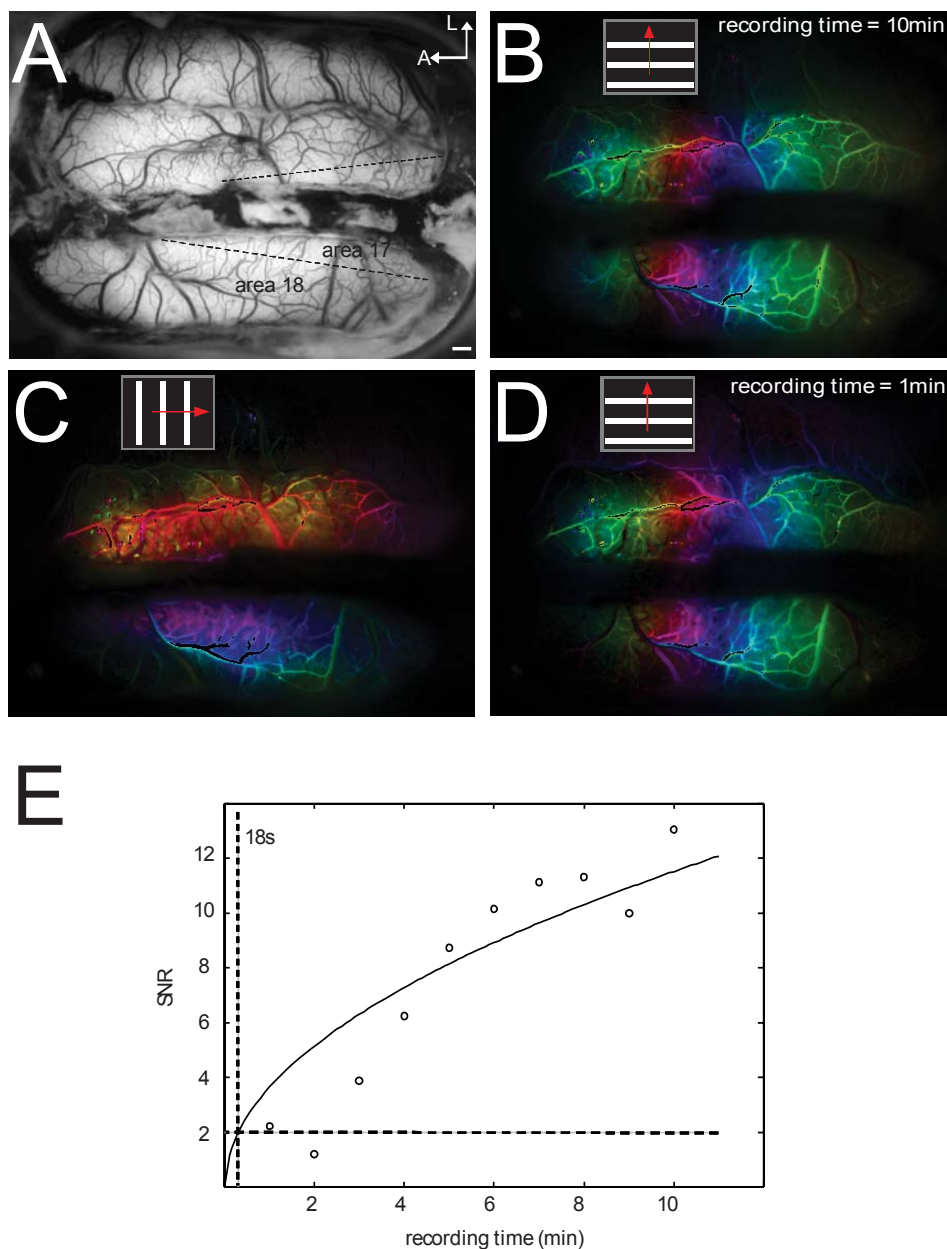
<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-18/4852/html/S0165027010001470/e7cdedda6e3a677842625a8aa22ae9fc/mm c5.mpg>

Supplementary video 5. Video of the stimulus used in figure 4, panel D.

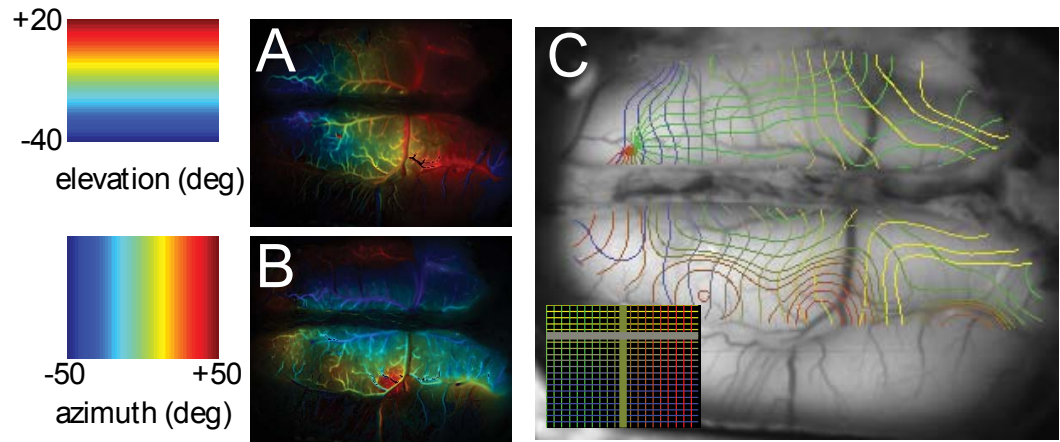
<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-19/4852/html/S0165027010001470/a7ec7a54e24fdff02ef1e69250cfb94c/mmc 6.mpg>

Supplementary video 6. Video of the stimulus used in figures 5 and 6.

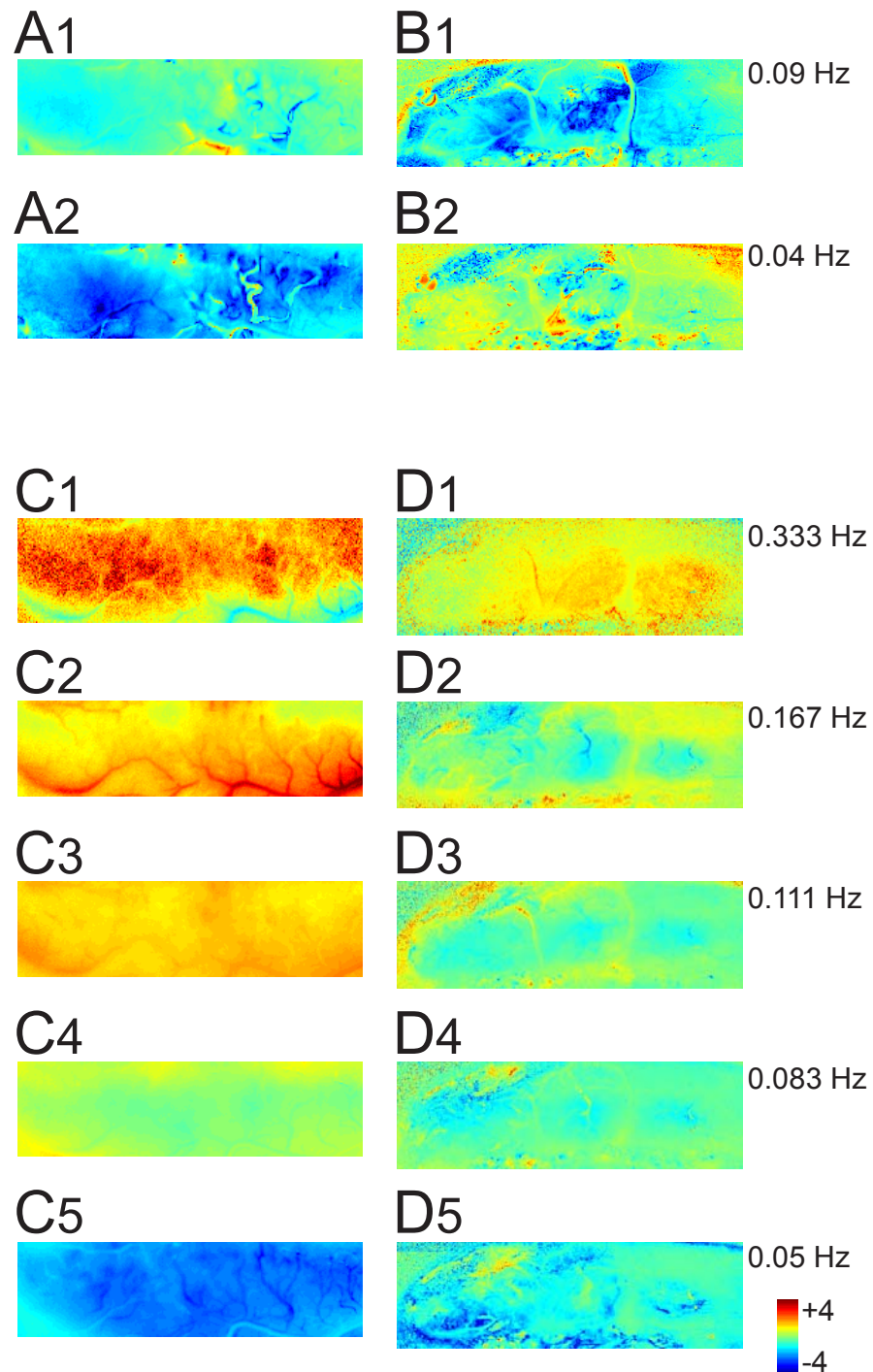
<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/B6T04-4YP8THJ-7/B6T04-4YP8THJ-7-1B/4852/html/S0165027010001470/75d54b9bd408cc8dd4f0b2b82b2e3e17/m mc7.mpg>



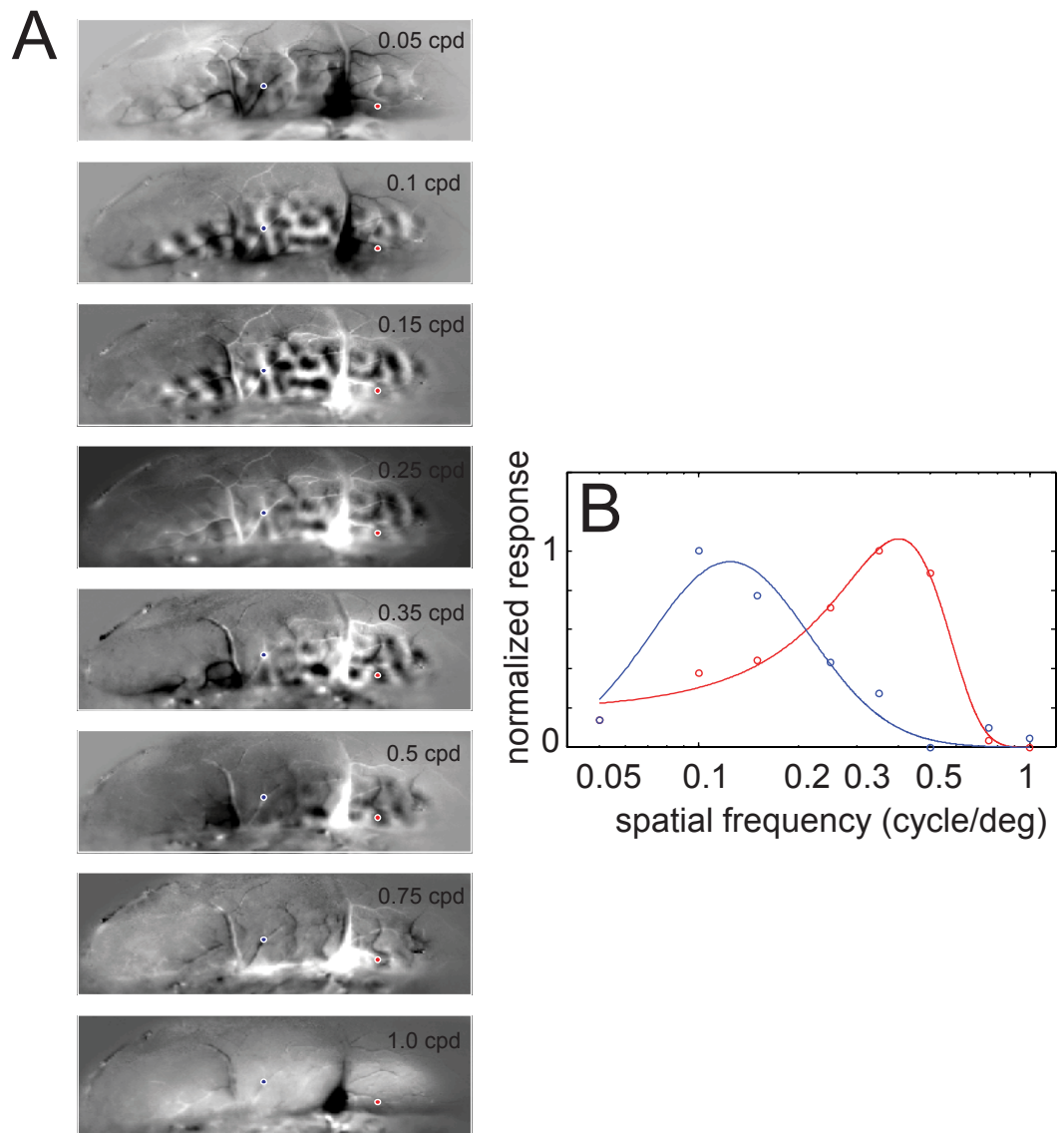
Supplementary figure 1. (A) Vasculature pattern of the imaged cortex. Scale bar = 1mm. (B) Phase map normalized with signal amplitude when three horizontal bars moving at the same frequency during a 10 min period were presented (case 5). (C) Same as in B but for vertical bars. (D) Same as in B but for a 1 min recording session. Note that the phases in panels B and D were aligned for clarity. (E) SNR as a function of recording time. SNR was defined as the peak of the signal at the first harmonic divided by the noise floor. The threshold value was defined by having a SNR greater than two (horizontal dashed line). The SNR values (dots) were fitted by a square root function (black line), allowing to evaluate the minimum recording time needed to have a SNR > 2 (vertical dashed line, 18s).



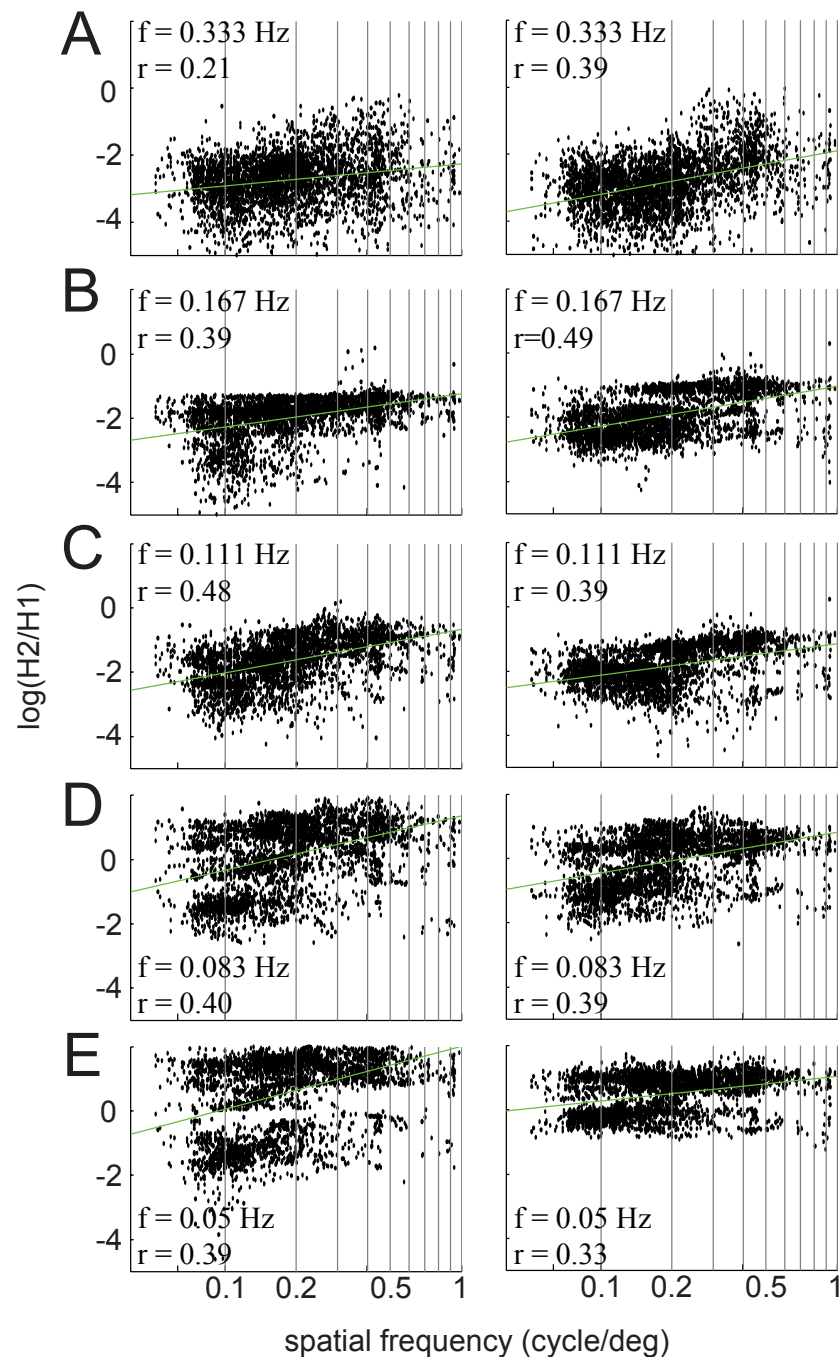
Supplementary figure 2. Visuotopic maps (from case 1) along elevation (panel A) and azimuth (panel B) corrected by the hemodynamic delay (as in Kalatsky and Stryker, 2003). (C) Isobars of the visuotopic representation (blue to yellow lines for elevation and green to red lines for azimuth). Note that the isobars were low pass filtered to remove the contribution of blood vessels.



Supplementary figure 3. (A) Ratio of HRF(ω_1)/HRF(ω_2) at 0.09 Hz (panel 1) and 0.04 Hz (panel 2) calculated from the periodic data shown in figures 5 and 6 (case 3). (B) Same as in panel B but for case 4, shown in figures 7 to 9. (C) Ratio of HRF(ω_1)/HRF(ω_2) at frequencies used in figure 7 calculated from the episodic data shown in figure 6 (case 3). (D) Same as in panel C but for case 4.



Supplementary figure 4. (A) Orientation maps evoked with 8 grating stimulus frequencies in the same ROI as in figure 7 (case 4). (B) Magnitude of the response as a function of the spatial frequency in 2 locations indicated in figure 10A (areas 17 and 18 in red and blue, respectively).



Supplementary figure 5. Correlation between spatial frequency and second to first harmonic ratio for downward (left column) and backward (right column) horizontal bars (case 4). Frequency of stimulation (f) and correlation coefficients (r) are shown for each graph. Considering the large number of pixels (i.e. thousands) and their spatial dependency in optical imaging, the statistical inference (i.e. the p value, close to zero) is not valid and was not shown. As a control, correlation coefficients computed from random harmonics were close to zero (not shown).

REFERENCES

- Albus K. A quantitative study of the projection area of the central and the paracentral visual field in area 17 of the cat. I. The precision of the topography. *Exp Brain Res*, 1975; 24: 159-79.
- Albus K, Beckmann R. Second and third visual areas of the cat: interindividual variability in retinotopic arrangement and cortical location. *J Physiol*, 1980; 299: 247-76.
- Bishop PO, Kozak W, Vakkur GJ. Some quantitative aspects of the cat's eye: axis and plane of reference, visual field co-ordinates and optics. *J Physiol*, 1962; 163: 466-502.
- Blasdel GG. Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. *J Neurosci*, 1992; 12: 3115-38.
- Bonhoeffer T, Grinvald A. Optical imaging based on intrinsic signal- the methodology. In A. W. Toga and J. C. Mazziotta (Eds) *Brain Mapping: The Methods*, 1996.
- Bosking WH, Crowley JC, Fitzpatrick D. Spatial coding of position and orientation in primary visual cortex. *Nat Neurosci*, 2002; 5: 874-82.
- Bosking WH, Kretz R, Pucak ML, Fitzpatrick D. Functional specificity of callosal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci*, 2000; 20: 2346-59.
- Buzas P, Volgushev M, Eysel UT, Kisvarday ZF. Independence of visuotopic representation and orientation map in the visual cortex of the cat. *Eur J Neurosci*, 2003; 18: 957-68.
- Cang J, Kaneko M, Yamada J, Woods G, Stryker MP, Feldheim DA. Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron*, 2005a; 48: 577-89.
- Cang J, Renteria RC, Kaneko M, Liu X, Copenhagen DR, Stryker MP. Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron*, 2005b; 48: 797-809.
- Chen-Bee CH, Agoncillo T, Xiong Y, Frostig RD. The triphasic intrinsic signal: implications for functional imaging. *J Neurosci*, 2007; 27: 4572-86.
- Ciuciu P, Poline JB, Marrelec G, Idier J, Pallier C, Benali H. Unsupervised robust nonparametric estimation of the hemodynamic response function for any fMRI experiment. *IEEE Trans Med Imaging*, 2003; 22: 1235-51.

- Cohen-Adad J, Chapuisat S, Doyon J, Rossignol S, Lina JM, Benali H, Lesage F. Activation detection in diffuse optical imaging by means of the general linear model. *Med Image Anal*, 2007; 11: 616-29.
- Cynader MS, Swindale NV, Matsubara JA. Functional topography in cat area 18. *J Neurosci*, 1987; 7: 1401-13.
- Das A, Gilbert CD. Distortions of visuotopic map match orientation singularities in primary visual cortex. *Nature*, 1997; 387: 594-8.
- Das A, Gilbert CD. Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature*, 1995; 375: 780-4.
- Dumoulin SO, Wandell BA. Population receptive field estimates in human visual cortex. *Neuroimage*, 2008; 39: 647-60.
- Dunn AK, Devor A, Dale AM, Boas DA. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage*, 2005; 27: 279-90.
- Engel SA, Rumelhart DE, Wandell BA, Lee AT, Glover GH, Chichilnisky EJ, Shadlen MN. fMRI of human visual cortex. *Nature*, 1994; 369: 525.
- Everson R, Knight BW, Sirovich L. Separating spatially distributed response to stimulation from background. I. Optical imaging. *Biol Cybern*, 1997; 77: 407-17.
- Gabbay M, Brennan C, Kaplan E, Sirovich L. A principal components-based method for the detection of neuronal activity maps: application to optical imaging. *Neuroimage*, 2000; 11: 313-25.
- Gias C, Hewson-Stoate N, Jones M, Johnston D, Mayhew JE, Coffey PJ. Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage*, 2005; 24: 200-6.
- Handwerker DA, Ollinger JM, D'Esposito M. Variation of BOLD hemodynamic responses across subjects and brain regions and their effects on statistical analyses. *Neuroimage*, 2004; 21: 1639-51.
- Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ. Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 2002; 12: 225-33.
- Husson TR, Mallik AK, Zhang JX, Issa NP. Functional imaging of primary

visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci*, 2007; 27: 8665-75.

Issa NP, Trepel C, Stryker MP. Spatial frequency maps in cat visual cortex. *J Neurosci*, 2000; 20: 8504-14.

Kalatsky VA, O'Connor EM, Tchesslavski GV, Kalatsky V. Concurrent multidimensional imaging of visual space representations in mouse visual cortex by Fourier optical imaging of intrinsic signals. *SfN abstract*, 2006; prog. 503.9.

Kalatsky VA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE, Stryker MP. Fine functional organization of auditory cortex revealed by Fourier optical imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102: 13325-30.

Kalatsky VA, Stryker MP. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron*, 2003; 38: 529-45.

Marrelec G, Benali H, Ciuciu P, Pelegrini-Issac M, Poline JB. Robust Bayesian estimation of the hemodynamic response function in event-related BOLD fMRI using basic physiological information. *Hum Brain Mapp*, 2003; 19: 1-17.

Mayhew JE, Askew S, Zheng Y, Porrill J, Westby GW, Redgrave P, Rector DM, Harper RM. Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage*, 1996; 4: 183-93.

Movshon JA, Thompson ID, Tolhurst DJ. Spatial and temporal contrast sensitivity of neurones in areas 17 and 18 of the cat's visual cortex. *J Physiol*, 1978; 283: 101-20.

Oلمان C, Ronen I, Ugurbil K, Kim DS. Retinotopic mapping in cat visual cortex using high-field functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci Methods*, 2003; 131: 161-70.

Polimeni JR, Granquist-Fraser D, Wood RJ, Schwartz EL. Physical limits to spatial resolution of optical recording: clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102: 4158-63.

Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci*, 2002; 22: 6549-59.

Sornborger A, Sailstad C, Kaplan E, Sirovich L. Spatiotemporal analysis of optical imaging data. *Neuroimage*, 2003; 18: 610-21.

Sornborger A, Yokoo T, Delorme A, Sailstad C, Sirovich L. Extraction of the

average and differential dynamical response in stimulus-locked experimental data. *J Neurosci Methods*, 2005; 141: 223-9.

Tootell RB, Mendola JD, Hadjikhani NK, Ledden PJ, Liu AK, Reppas JB, Sereno MI, Dale AM. Functional analysis of V3A and related areas in human visual cortex. *J Neurosci*, 1997; 17: 7060-78.

Tusa RJ, Palmer LA. Retinotopic organization of areas 20 and 21 in the cat. *J Comp Neurol*, 1980; 193: 147-64.

Tusa RJ, Rosenquist AC, Palmer LA. Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol*, 1979; 185: 657-78.

Van Hooser SD, Heimel JA, Chung S, Nelson SB, Toth LJ. Orientation selectivity without orientation maps in visual cortex of a highly visual mammal. *J Neurosci*, 2005; 25: 19-28.

Vanni MP, Provost J, Casanova C, Lesage F. Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage*, 2010; 49: 1416-31.

Vanni MP, Provost J, Casanova C, Lesage F. Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage*, 2009; 49: 1416-31.

Vanni MP, Villeneuve MY, Provost J, Lesage F, Casanova C. Orientation and direction selectivity in the cat visual cortex by spectral decomposition of the optical imaging signals. *SfN abstract*, 2007; prog. 920.11.

Villeneuve MY, Vanni MP, Casanova C. Modular organization in area 21a of the cat revealed by optical imaging: comparison with the primary visual cortex. *Neuroscience*, 2009; 164: 1320-33.

Zepeda A, Arias C, Sengpiel F. Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods*, 2004; 136: 1-21.

ARTICLE 3b

Publié dans Neuroimage. 2010 Jan 15;49(2):1416-31.

Bimodal Modulation and Continuous Stimulation in Optical Imaging to Map Direction Selectivity

M. P. Vanni^{1,2}, J. Provost^{3,*}, C. Casanova¹ and F. Lesage³

¹ Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

³ Département de génie électrique et Institut de génie biomédical, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Christian Casanova
Laboratoire des Neurosciences de la Vision
École d'optométrie
Université de Montréal
CP 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7
Tel. (514) 343-2407
Fax. (514) 343-2382

Web: <http://www.opto.umontreal.ca/neurosciences/>

(*) Present address: Biomedical Engineering Department, Columbia University, New York, NY, USA.

Keywords : area 17, area 18, cat, Fourier, intrinsic signals, orientation selectivity, spatial frequency, motion, visual cortex, cortical map

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NSERC, CIHR MOP-14825, and NEI R01EY016155 grants to C.C. and a NSERC grant to F.L. FRSQ provided part of C.C.'s salary (chercheur national program). JP was supported by a NSERC scholarship. M.P.V. was supported in part by "Foreign Affairs and International Trade" and "Faculté des études supérieures" fellowships. We thank Martin Villeneuve, Karine Minville and Marilyse Piché for their helpful assistance during experiments. We thank Jonathan Roy, Bertrand Guay-Paquet, Nicolas Rousseau-Dupuis, Marc Melillo and François Vaillancourt for building the stimulus generator and LED device.

ABSTRACT

In the visual system, neurons with similar functional properties such as orientation and direction selectivity are clustered together to form modules. Optical imaging recordings in combination with episodic paradigms have been previously used to estimate direction selectivity, a fundamental property of visual neurons. The major drawback of the episodic approach is that the extraction of the signal from various forms of physiological noise is difficult, leading to a poor estimation of direction. Recent work, based on periodic stimulation and Fourier decomposition improved the extraction of periodic stimulus responses from noise and thus, reduced the recording time considerably. Given the success of this new paradigm in mapping orientation, the present study evaluated its reliability to measure direction selectivity in the visual cortex of anaesthetised cats. Here, a model that exploits the harmonics of the Fourier decomposition is proposed where the first harmonic is related to direction responses, and the second to orientation. As expected, the first harmonic was absent when a static stimulus was presented. Contrarily, the first harmonic was present when moving stimuli were presented and the amplitude was greater with random dots kinematograms than with drifting gratings. The phase of the first harmonic showed a good agreement with direction preference measured by episodic paradigm. The ratio of the first / the second harmonic amplitude, related to a direction index, was weaker in fracture. It was also weaker in areas of the ventral pathway (areas 17 and 21a) where direction selectivity is known to be reduced. These results indicate that a periodic paradigm can be easily used to measure specific parameters in optical signals, particularly in situations when short acquisition periods are needed.

INTRODUCTION

It is well established that, in sensory systems, neurons with similar functional properties are clustered together to form modules. On the surface of the cortex, the selectivity of neurons changes gradually, forming cortical maps, such in the case of orientation in the primary visual cortex of cats and primates (Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Frostig et al., 1990; Grinvald et al., 1986). In these maps, orientation selectivity of neurons changes steadily, forming domains that converge in singularities called “pinwheels”. A separate clustering of direction selectivity associated with orientation maps has also been revealed (Swindale et al., 1987; Tolhurst et al., 1981). This arrangement ultimately leads to the formation of direction selectivity maps. Along this spatial functional organization, iso-orientation columns are divided into columns of preference for opposite directions, orthogonal to the preferred orientation (Henry et al., 1974; Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Ribot et al., 2008; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003).

The organisation of direction selectivity was previously investigated by optical imaging of intrinsic signals (Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Ribot et al., 2008; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003). In the first complete study (Shmuel and Grinvald, 1996), direction selectivity was calculated by the “vector sum”, a method generally used to compute orientation selectivity (Bonhoeffer and Grinvald, 1991, 1996; Grinvald et al., 1986; Kisvarday et al., 2001; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale, 1998). This approach is not ideal, particularly in regions of low selectivity because, in contrast to orientation, direction tuning is bimodal (Kisvarday et al., 2001; Swindale et al., 2003). Thus, when responses of opposite directions are close and the noise contribution significant, the vector sum does not provide a good estimate of direction preference and breaks the orthogonality between orientation and direction. To resolve this problem, (Kisvarday et al., 2001) proposed to use the “vector maximum method” to evaluate direction selectivity. Yet, this alternative approach suffers from a low angular resolution and remains sensitive to noise (Swindale et al., 2003). A second alternative using the fit of the direction tuning by two von Mises functions, was proposed (Swindale, 1998; Swindale et al., 2003). While this method answers the above

concerns, it is however based on the analysis of data recorded in episodic paradigms (i.e. block design). The signal is therefore combined with physiological noise and long recording sessions are needed to increase the signal to noise ratio (by averaging the signal over multiple acquisitions). In some situations, averaging is nevertheless insufficient and additional processing, such as 2D-filtering (Fukuda et al., 2006; Ribot et al., 2006), PCA decomposition (Everson et al., 1997; Gabbay et al., 2000; Stetter et al., 2000; Yokoo et al., 2001), estimation of noise contributions by polynomial subtraction (Ribot et al., 2006) or local similarity minimization (Fekete et al., 2009), must be applied.

Separately, time-locked or periodic techniques have been proposed (Kalatsky and Stryker, 2003; Sornborger et al., 2003; Sornborger et al., 2005). In contrast to episodic paradigms, the periodic approach (i.e. continuous stimulation) combines different conditions by periodically changing the orientation of a stimulus (e.g. grating) and recovers the response by using amplitude and phase information at the stimulation frequency. Experiment duration is thus considerably reduced while more angular conditions are explored since an “infinite” number of orientations can theoretically be presented.

While the periodic method proved to be successful in measuring orientation selectivity in cats (Jha et al., 2005; Kalatsky and Stryker, 2003) and tree shrews (Zepeda et al., 2004), it has never been used to quantify direction selectivity, a fundamental property of visual neurons. In this work, a model-based periodic paradigm is studied for the first time to evaluate direction selectivity from multiple harmonics. A direction index, based on the first and second harmonic of the Fourier decomposition is proposed and tested with different visual stimuli in areas 17, 18 and 21a of the cat, and compared with episodic paradigms. As a demonstration of the exportability, the model is also applied to evaluate the monocular / binocular recipient zones in rodents' primary visual cortex. Part of this work has been previously published in abstract form (Vanni et al., 2007).

METHODS

Model

In this section, notations are introduced for the standard periodic stacking method by including the canonical HRF previously developed (Vanni et al., submitted). The model assumes that measurements are taken with a camera positioned over the cortex to image a zone where activation patterns are expected (Bonhoeffer and Grinvald, 1996). The cortex is illuminated by light at a wavelength for which haemoglobin dominates the absorption (Dunn et al., 2005). The images are recorded continuously to form a dynamical image $I(t)$. Since only one wavelength is used in this work, it is assumed that a combination of deoxyhaemoglobin (HbR) and oxyhaemoglobin (HbO) is measured. For a point in the cortical image, $\{ij\}$, the measured attenuation can be modeled as the sum of a physiological signal and the response to the stimuli, i.e.

$$I_{ij}(t) = \alpha_{ij} HRF_{ij}(t) * R_{ij}\{s(t)\} + b_{ij}(t) + e_{ij}(t), \quad (1)$$

where e_{ij} represents the acquisition noise (e.g. generated by the camera), b_{ij} , the physiological signals, namely respiration, cardiac pulsations and vasomotion, and $s(t)$, the stimulation vector defined as $s(t)=1$ when the stimulation is on, zero otherwise. The specificity of the neuronal response is described by a functional, R_{ij} , describing the normalized response of the neuron to the given stimulus with a response strength α_{ij} , and $HRF_{ij}(t)$ is the haemodynamic response function which convolves the stimuli. It is understood here that the HRF represents the response to a combination of oxy- and deoxy-haemoglobin depending on the illumination wavelength.

In previous work, haemodynamic measurements associated with the above model were used to study the response shape (e.g. the width of the neuronal response in a retinotopic paradigm). This work is extended here by considering a bi-modal stimulation paradigm. Consider the following: a stimulus moving in a direction that continuously rotates at frequency ω_1 . If this stimulus is a sinewave grating, with its orientation orthogonal to its direction, the orientation and direction selectivity of neurons can be modeled by a response function

taking the form

$$R_y \{s_1(t) + s_2(t)\} = \alpha_y^{(1)} R_y^G \{s_1(t)\} + \alpha_y^{(2)} R_y^G \left\{ s_1 \left(t - \frac{\pi}{\omega_1} \right) \right\}. \quad (2)$$

In this formula, the direction selectivity is encoded in the response amplitudes, α_{ij} , which are associated with preferred directions. If both $\alpha_{ij}^{(1)}$ and $\alpha_{ij}^{(2)}$ are equal, neither direction can be distinguished from the other and only the orientation response will be measured. If only one $\alpha_{ij}^{(a)}$ is non-zero, then the direction component dominates the response. This is apparent when taking the Fourier transform of the above expression,

$$R_y \{s_1 + s_2\}(\omega) = R_y^G \{s_1\}(\omega) (\alpha_y^{(1)} + \alpha_y^{(2)} e^{-i\frac{\pi}{\omega_1}\omega}) \quad (3)$$

where, for simplicity, the function R_{ij}^G assumed to be described by a periodic Gaussian centered on the preferred orientation at that location in the cortex, i.e.

$$R_y^G \{s\}(\omega) = e^{-\omega^2 \sigma^2 / 2} S_{ij} \{s\}(\omega) \quad (4)$$

and S_{ij} the periodic Dirac response. These Gaussian functions are introduced to model the tuning widths of the underlying neurons. It can be observed that the Fourier transform of (2) will exhibit two peaks, one at ω_1 and one at $\omega_2=2\omega_1$, each having a distinct interpretation in terms of orientation and direction. Consider two special cases. First, if both $\alpha_{ij}^{(a)}$ are equal, (3) will be zero at $\omega=\omega_1$ while non-zero at the second harmonic, $\omega=2\omega_1$. This is the orientation response where the phase can be associated with the preferred orientation. On the other hand, if one $\alpha_{ij}^{(a)}$ is zero, then the first harmonic will have a non-zero response and the phase will correspond to the direction selectivity. Thus, in view of the above model, the amplitude and phase of the responses located at those two peaks can be related to direction selectivity. In fact, it is possible to develop measures that are independent of the contrast or the strength of the response. For example, a quantity of interest, introduced by

(Swindale et al., 2003) is the direction index, here referred to as periodic direction index (PDI) because of the nature of the stimulation (i.e in contrast to the episodic direction index (EDI)):

$$PDI_{ij} = \frac{(\alpha_{ij}^{(1)} - \alpha_{ij}^{(2)})}{(\alpha_{ij}^{(1)} + \alpha_{ij}^{(2)})} \quad (5)$$

It measures the direction selectivity of a group of neurons at a given location. Combining (3) and (1), and assuming physiological signal and noise are much lower than the signal at the stimulation frequency, it can be shown that

$$\left| \frac{I_{ij}(\omega_1)}{I_{ij}(2\omega_1)} \right| = \left| \frac{(\alpha_{ij}^{(1)} - \alpha_{ij}^{(2)})}{(\alpha_{ij}^{(1)} + \alpha_{ij}^{(2)})} \right| \left| \frac{HRF(\omega_1)}{HRF(2\omega_1)} \right| e^{\frac{3}{2}\omega_1^2\sigma_{ij}^2} = PDI_{ij} K_{ij}(\omega_1) = PDI' \quad (6)$$

where σ_{ij} describes the temporal width at that stimulation frequency of the modeled Gaussian response of the neurons to orientation and $HRF(\omega)$ is the Fourier transform of the HRF. Thus, the remaining factor $K_{ij}(\omega_1)$ depends on both the HRF and σ_{ij} and may vary spatially. However, the experimental observations below indicate that this variation is small when compared to the changes of PDI_{ij} and the scaled index PDI' defined above will be used in the comparisons below. In theory, the dependence on the tuning width can be removed by using higher harmonics and more complex expressions, an example is:

$$\left| \frac{I_{ij}(\omega_1)}{I_{ij}(2\omega_1)} \left(\frac{I_{ij}(3\omega_1)}{I_{ij}(4\omega_1)} \right)^{-3/7} \right| = \left| \frac{(\alpha_{ij}^{(1)} - \alpha_{ij}^{(2)})}{(\alpha_{ij}^{(1)} + \alpha_{ij}^{(2)})} \right|^{4/7} \left| \frac{HRF(\omega_1)}{HRF(2\omega_1)} \left(\frac{HRF(3\omega_1)}{HRF(4\omega_1)} \right)^{-3/7} \right| \quad (7)$$

but high accuracy up to four harmonics is necessary.

Figure 1 summarizes the previous description. Panel A shows schematic responses associated with three different degrees of direction selectivity when a stimulus of continuously and periodically changing direction is used. When the direction selectivity is high, a response is observed only for a preferred

direction, resulting in a unique harmonic at the frequency of the stimulus. In contrast, when the direction selectivity is absent, the preferred and anti-preferred directions trigger responses of equal amplitudes, resulting in a unique harmonic at twice the frequency of the stimulus (i.e. two responses per rotation). In a general setting, the ratio of the first to the second harmonic (PDI') provides a measure of the selectivity for direction. Panel B shows a schematic representation of the temporal (B1) and frequency (B2) profiles of neuronal and optical responses. It shows that optical signals result from neuronal responses weighted by the HRF which acts as a low pass filter. As described in the model above (see Eq. 6) and illustrated in panel B, the ratio of the first to second harmonic (PDI') is related to the direction index (PDI) of neurons within the pixel.

Animal preparation

Seven adult cats (2.5 – 3.5 kg), two mice and one rat were used in this study. All procedures were made in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals, and the experimental protocol was accepted by the Ethics Committee of the Université de Montréal. Throughout the experiment, the cats were placed in a stereotaxic frame and artificially ventilated with a mixture of halothane (Fluothane®, 0.6 – 0.8 %) in O₂/N₂O (30% / 70%). Muscular relaxation was obtained by the continuous injection of gallamine triethiodide (2%) infused with 5% dextrose in a lactated Ringer's injection solution. End-tidal CO₂, blood pressure, blood oxygen saturation, core temperature, electroencephalogram and electrocardiogram were continuously monitored to evaluate the depth of anaesthesia and the animal welfare. An antibiotic (Tribissen 24%, 0.125 mL/kg/day) was injected s.c. to prevent infections. Pupils were dilated with atropine sulfate 1% (Isopto®) and the eyes were protected using contact lenses of appropriate refractive power (+2). The rat was artificially ventilated with a mixture of isoflurane (Forane®, 1.0 – 1.5 %) in O₂ (100%). Mice were breathing spontaneously in pure O₂ and were anesthetised with urethane (1.25 g/kg, ip).

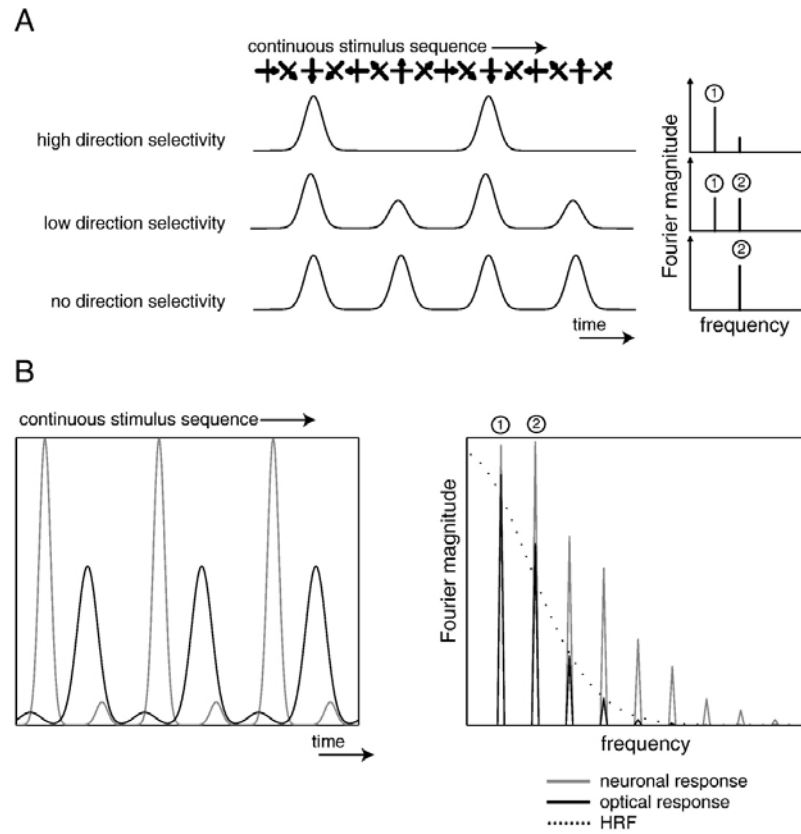


Figure 1. (A). Diagram of the neuronal response and Fourier decomposition for three degrees of direction selectivity. (B). Schematic of the neuronal (gray) and optical (black) responses in temporal (left) and frequency (right) spaces.

In cats, a 27 x 20 mm craniotomy was performed over the primary visual cortex at Horsley Clarke coordinates AP -10 to +17 and ML -10 to +10, and the dura was incised to access the cortex. In one case, optical signals were recorded in the neighbouring area 21a. The cat used for this recording was part of another study (Villeneuve et al., submitted). To demonstrate the versatility of the method, the rodent visual cortex was also imaged. In rats, bilateral craniotomies were performed over the primary visual cortex and the dura was left intact. The mouse cortex was imaged through the skull, i.e. without any craniotomy. Imaging chambers were filled with silicone oil (cats) or Agarose in saline (rat and mice) and sealed with a glass plate. At the end of each experiment, the animals were killed by an injection of sodium pentobarbital (cats and rats; Euthanyl, 100mg/kg) or by over inhalation of Isoflurane (mice).

Acquisition and stimulation

The cortex was illuminated at 545 nm to reveal the vascular pattern of the cortical surface and at 630 nm to record the intrinsic signals. Images were recorded with a 12 bits CCD camera (1M60, Dalsa, Colorado Springs, USA) fitted with a macroscopic lens (Nikon, AF Micro Nikkor, 60mm, 1:2.8D).

For direction selectivity measurements, full-screen visual stimuli were generated using a custom made software (STIMPlus) and presented on a 21-in computer screen placed 19 cm in front of the cat eyes. Stimuli were stationary (i.e. static) or drifting (i.e. dynamic) sine-wave gratings (0.15 to 0.5 c/deg) and random-dot kinematograms (RDKs, 0.1 dot per square degree) displayed binocularly and moving at definite velocities (15 or 40 deg/s). For episodic stimulation, the direction of motion was changed pseudo-randomly (16 different values) while for periodic stimulation, it was changed continuously in a counter-clockwise manner at a fixed frequency varying across experiments between 0.006 Hz and 0.167 Hz (see Figure 2B in Kalatsky and Stryker 2003). Continuous acquisition lasted 10 to 30min with a 2-8 Hz sampling frequency. For episodic stimulation, stimuli were presented during 8s and spaced by 10s intervals after which the next stationary stimulus was presented: the total acquisition time lasted 3 hours with a sampling frequency of 0.6 Hz.

To determine binocular and monocular responses in rodents, full-screen visual stimuli were presented independently to each eye and consisted on a white light emitting diode in direct contact with the eyes (Figure 10, panel A). The surfaces of the LED were drilled to fit the convex curvature of cornea and to stimulate the retina uniformly. Flashes were presented at a frequency of 5Hz during 3s, alternating to the right and left eyes with a period of 12s. Acquisition lasted 10min with a sampling frequency of 8 Hz.

Offline pre-processing and episodic analysis

The data were imported into Matlab (The Mathworks, Nattick, MA) for further analysis. Continuous stimulation signals were subtracted by a normalized temporal pattern of lighting instability (Nassim et al., submitted). For measurements of direction selectivity, frames were band-pass filtered ($0.001 - 0.01 \mu\text{m}^{-1}$) to remove low and high frequency noise which affects the modular organisation (Fukuda et al., 2006; Jha et al., 2005; Ribot et al., 2006). A Fourier transform was performed on the temporal signal of each pixel to obtain phase and magnitude spectra. To reduce the contribution of the physiological components in our quantitative measurements, baselines (corresponding to the noise floor and obtained by smoothing the spectra with a cut-off of 0.05 Hz) were subtracted from magnitude spectra. The PDI' was estimated by taking the ratio between the average values of the first and second harmonics in a delimited region of interest. This ratio is related to the periodic direction index (PDI, see eq. 6 of the model) and was compared to the episodic direction index (EDI). Because we did not correct the ratio by the factor $K_{ij}(\omega_1)$, we decided to call the present ratio: PDI' to avoid any confusion. A local 2D-circular-gradient $\nabla\varphi$ was used to localize fractures in preferred orientation and direction maps (rate of change; (Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003)), defined by:

$$\nabla\varphi = \sqrt{\nabla\cos(\varphi)^2 + \nabla\sin(\varphi)^2} \quad (8)$$

where

$$\nabla \cos(\varphi) = \frac{\partial \cos \varphi}{\partial x} \hat{i} + \frac{\partial \cos \varphi}{\partial y} \hat{j} \text{ and } \nabla \sin(\varphi) = \frac{\partial \sin \varphi}{\partial x} \hat{i} + \frac{\partial \sin \varphi}{\partial y} \hat{j} \quad (9)$$

with φ , the phase at the first or second harmonic, x and y the vertical and horizontal dimensions (in mm). The decomposition of vertical and horizontal components was used to prevent “circular logic”.

Episodic analysis is based on the vector averaging of responses (Bonhoeffer and Grinvald, 1996; Shmuel and Grinvald, 1996) or Von Mises fitting method (Swindale, 1998; Swindale et al., 2003). For orientation, trials were summed for the same-orientation-opposite-direction. Orientation and direction single condition maps (averages of 30-40 trials) were then band-pass filtered. The general framework of the Von Mises fitting method described in (Swindale et al., 2003) was used to recover preferred orientation, preferred direction, magnitude of orientation selectivity and episodic direction index (EDI) defined as:

$$EDI = \frac{|A_1 - A_2|}{A_1 + A_2} \quad (10)$$

where A_1 is the magnitude for preferred and A_2 for anti-preferred directions (Swindale et al., 2003).

The degree of similarity between maps was measured by computing correlation coefficients. In the case of polar maps (e.g. direction and orientation maps), a transformation in polar coordinates was done prior to the calculation, and the r -values corresponded to the summation of the r -values of sine and cosine components of the maps. Given the large number of pixels, the statistical inference (p) could not be considered as valid and consequently will not be shown.

Based on the linearity of the response, it is possible to estimate the HRF profile in the frequency domain by the assumption:

$$|HRF(\omega)| \approx k \frac{|I_{ij}(\omega)|}{(N+1)} \quad (11)$$

with N, the number of presentation of the stimulus and k, a factor described in (Vanni et al., submitted).

RESULTS

First and second harmonics to evaluate direction and orientation selectivity

The first series of experiments confirmed that the Fourier transform can be used to reveal direction selectivity from the profile of the neuronal response. Figure 2 shows typical recordings in one location in area 18 of the cat for three stimuli evoking different degrees of direction selectivity. Panel A shows the profile of the response with periodic and episodic paradigms for three distinct stimuli: RDK (15 deg/s), static and dynamic gratings. For each stimulus, periodic and episodic paradigms provided comparable response profiles with the exception of a slight delay between the periodic and the episodic paradigms. This delay is presumed to originate from the hemodynamic response. Panel B provides the Fourier transform of the profiles obtained with the periodic paradigm. In B₁, stimulation with a static grating does not evoke any direction components. This results in two equal responses per rotation at the preferred orientation leading to a lack of response at the first harmonic and a strong response at the second (PDI' = 0). A small peak at the fourth harmonic was also observed. As described in (Vanni et al., submitted), this component is attributable to the profile of the neuronal response (i.e. tuning bandwidth).

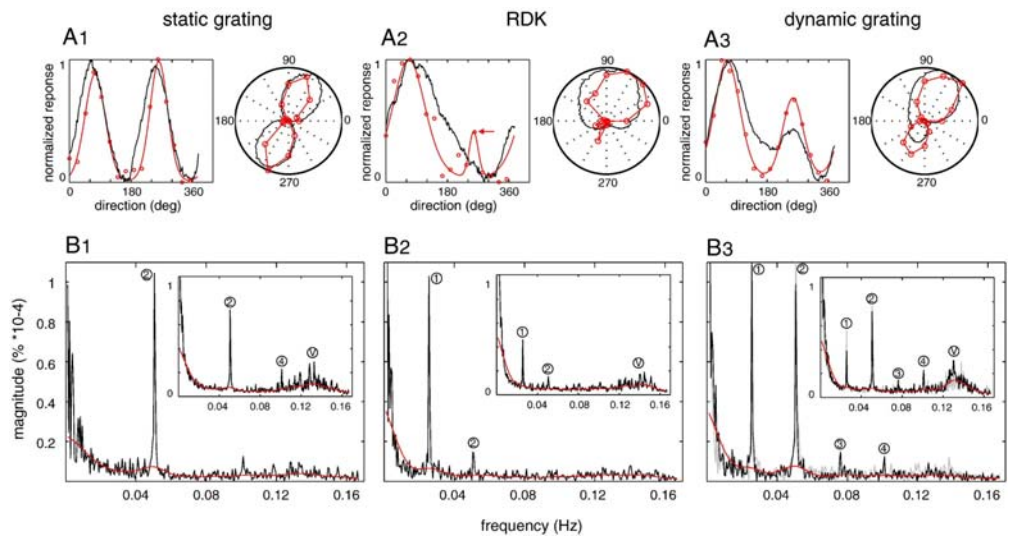


Figure 2. (A) Profile of the response in one location of area 18 (indicated in Figure 3) with periodic (black) and episodic (red) paradigms for three stimuli: RDK, static and dynamic gratings. Red lines in the left tuning curves are the fit by the Von Mises function. In panel A2, the response to the opposite direction appearing at 247.5 deg was the result of noise contribution (filled arrow). (B) Fourier transform of the profiles with the periodic paradigm where first, second, third and fourth harmonics are indicated. Stimulus frequency (rotation) was 0.025 Hz (1/40s). Red lines are the baseline of the physiological noise and were used to correct the spectra for quantification. Inset: average spectra of every location indicated by the box in Figure 2. Abbreviation V: Vasomotion (and thereafter in Figures 6, 8 and 10). Gray spectra in B3 are obtained with a clockwise stimulation.

In B_2 , RDK, which are known to yield robust direction components, evoked a strong response at the first harmonic. A small peak at the second harmonic was also observed ($PDI' = 3.6$). It is noticeable that this second harmonic derives from direction selectivity (i.e. in reference to the response at the anti-preferred direction) but can also originate, in part, from the direction tuning bandwidth as previously mentioned for orientation. Increasing the velocity of the RDK did not provide a significantly different profile (40deg/s, data not shown). Finally, in B_3 , stimulation with a dynamic grating evokes both direction and orientation components causing a response for the preferred but also for the anti-preferred direction with weaker amplitude. The result was the presence of components both at the first and second harmonics ($PDI' = 0.5$ and 0.7 in two separate measures).

Spatial maps of first and second harmonics for these three stimuli are shown in Figure 3. Panel 1 shows the response for a static grating. In agreement with the spectra presented above, there was no response at the first harmonic (panel B1) whereas a clear orientation selectivity map was imaged at the second harmonic (i.e. presence of domains and pinwheels, panel C1). This led to an absence of direction selectivity and a PDI' close to zero (panel D). At the location of pinwheels, the magnitude of the second harmonic was always smaller than that observed in the domains. Panel 2 shows the response for RDK. A clear modular organisation was observed at the first harmonic which is likely to correspond to the direction selectivity map (panel B2 and C2). The corresponding PDI' map has high values associated with high direction selectivity (panel D2). Panel 3 shows the response to a dynamic grating. A clear modular organisation was observed at the first harmonic, similar to that obtained with RDK in panel B2 (panel B3). A clear modular organisation was also observed at the second harmonic (panel C3) and was comparable to the one found with the static grating in panel C1. These observations support the idea that the first harmonic can be considered as carrying direction and the second harmonic, orientation. Finally, due to the presence of orientation components, the values of the PDI' map were weaker than those with a RDK stimulus (panel D3).

Table 1 reports the similarity of phase maps as a function of the recording time. When the recording was split into two equal sub-recordings, the resulting maps were comparable (shaded row). These results confirmed that those maps cannot be ascribed to background noise. The maps obtained during a 30min recording period were compared with those acquired with periods inferior to 30min in duration. The goal was to evaluate the minimum amount of time necessary to obtain a map similar to the reference map (i.e., that acquired in 30min). The signal to noise ratio (SNR) of each recording session was also evaluated. It was defined as the peak of the signal at the first or second harmonic divided by the noise floor. The threshold value was defined by having a SNR greater than two. Results revealed that reliable second harmonic maps (orientation) can be imaged in only 1-2min while first harmonic maps (direction) can be obtained around 10-15min, a value acceptable when short-recording sessions are mandatory. The same quality of images was indeed reached 5-10 times faster than with the episodic paradigm (data not shown).

The maps obtained above (periodic paradigm) were compared to those acquired with an episodic paradigm (Figure 4). Panels A and B show orientation selectivity maps for dynamic and static gratings. These maps were similar to each other and to that of the second harmonic shown in Figure 3 (panels C1, C3). Panels C and D display direction selectivity maps for both dynamic gratings and RDK. These maps were also similar to each other and to that of the first harmonic shown in Figure 3 (B2 and B3). As expected, a clear relationship was observed between the phase of the second harmonic and the preferred orientation ($r=0.87$ for dynamic and $r=0.82$ for static grating, panel E), and between the phase of the first harmonic and the preferred direction ($r=0.58$ for dynamic grating and $r=0.59$ for RDK, panel F). Panel G shows a linear relationship between the magnitude at the second harmonic and the orientation magnitude ($r = 0.85$ and $r = 0.72$ for dynamic and static gratings). Finally, panel H shows the relationship between the PDI' and the EDI. When RDK and dynamic gratings indexes are pooled together, a clear relation is observable: pixels from RDK had higher values while those from dynamic

grating had lower values ($r = 0.42$). The PDI' was higher than the EDI (by one order of magnitude). This is explained by the weighting of the PDI and a factor related to HRF and bandwidth (see Eq. 6 of the model) which act as a low-pass filter, promoting the first harmonic more than the second and thus, increasing PDI' (see Figure 1, Figure 8, panel C and (Vanni et al., submitted)). Similar results were observed when the periodic paradigm was compared to the vector sum measurements (for orientation; $r = 0.82$ and $r = 0.87$ for static and dynamic gratings respectively, for direction; $r=0.73$ and $r = 0.69$ for dynamic grating and RDK, respectively) or vector max computation (for orientation; $r = 0.64$ and $r = 0.72$ for static and dynamic gratings; and for direction; $r = 0.51$ and $r = 0.55$ for dynamic grating and RDK).

To further confirm that first and second harmonics can provide information on direction and orientation, cross validation between these components was evaluated as an internal validation shown in Figure 5. A good correlation was observed for the phase ($r=0.95$, panel C) and magnitude ($r=0.98$, panel A) of the second harmonic between static and dynamic gratings even though direction components were present in the second stimulus. Similarly, there was a good correspondence between the phase of the first harmonic for RDK and that for dynamic gratings despite the existence of orientation components in the latter ($r = 0.85$, panel B). The relationship between PDI' for RDK and dynamic gratings is presented in panel D ($r = 0.47$). Because of the presence of orientation components contributing to the second harmonic, the PDI' was one order of magnitude lower for dynamic gratings than for RDK.

Correlation between the phase of the first and the second harmonics was also evaluated to determine the angular relationship between orientation and direction (panel E). When tested with a dynamic grating, a correlation was observed between the phase of the first and the second harmonic. As shown by (Swindale et al., 2003) the relationship revealed an orthogonality: each second harmonic phase (orientation) was associated with a first harmonic phase (direction) shifted by $\pi/2$ or $3\pi/2$ in reference to the former. However, compared to (Swindale et al., 2003) the relationship was noisy (points in Figure E, $r = 0.25$). The exclusion of pixels of fracture and low direction selectivity considerably increased the correlation (circles in Figure E, $r = 0.66$).

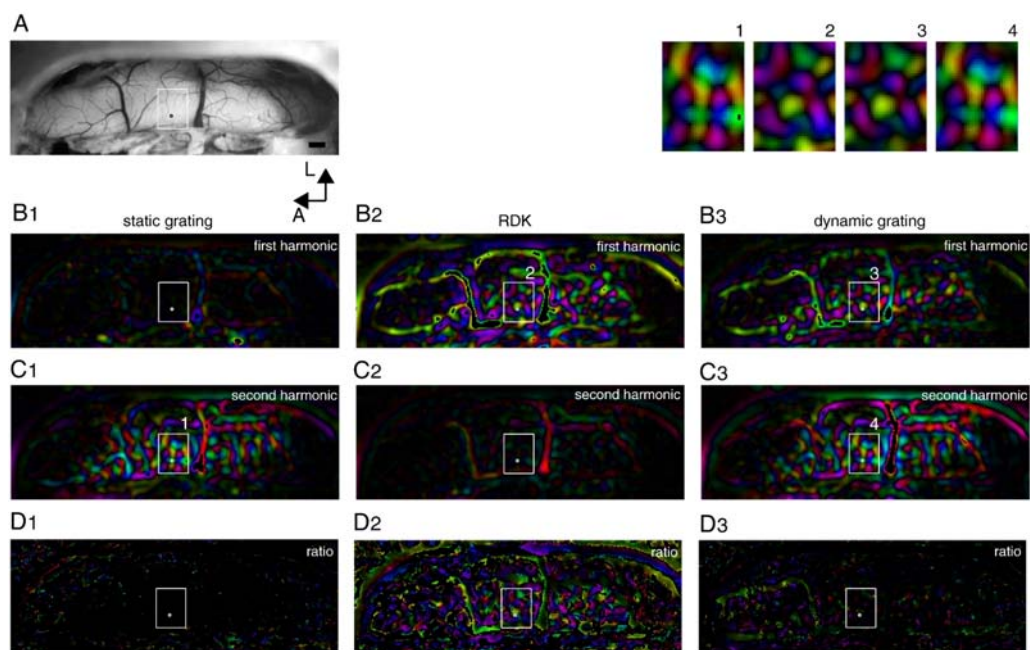


Figure 3. (A) Vasculature pattern in the region of interest in area 18. The circle indicates the location of the pixel used in Figure 2. The box shows the location of the group of pixels used for quantification in Figures 2, 4, 5 and 6. Scale bar = 1mm. (B and C) Phase maps normalized by amplitude maps at the first and second harmonic for three stimuli: RDK, static and dynamic grating. (D) Phase maps at the first harmonic normalized by the ratio of the first to second harmonic (PDI'). Fourier phases have been corrected to facilitate the comparison with episodic paradigm in Figure 4. Boxes labelled 1 (in C1), 2 (B2), 3 (C3) and 4 (B3) were enlarged and shown in the upper-right inset.

min vs. min	Second harmonic r (SNR)	First harmonic r (SNR)
15 vs. 15	0.91	0.83
30 vs. 15	0.97 (6.5)	0.88 (3.3)
30 vs. 10	0.98 (6.5)	0.88 (1.8)
30 vs. 5	0.96 (5.0)	0.72 (0.7)
30 vs. 3	0.96 (3.3)	0.63 (0.6)
30 vs. 2	0.94 (2.4)	0.69 (0.7)
30 vs. 1	0.87 (2.1)	0.47 (0.6)

Table 1. Correlation coefficients (r) between phase maps as a function of the time of recording. Numbers in brackets are the signal to noise ratio (SNR) defined as the peak amplitude to noise floor measure.

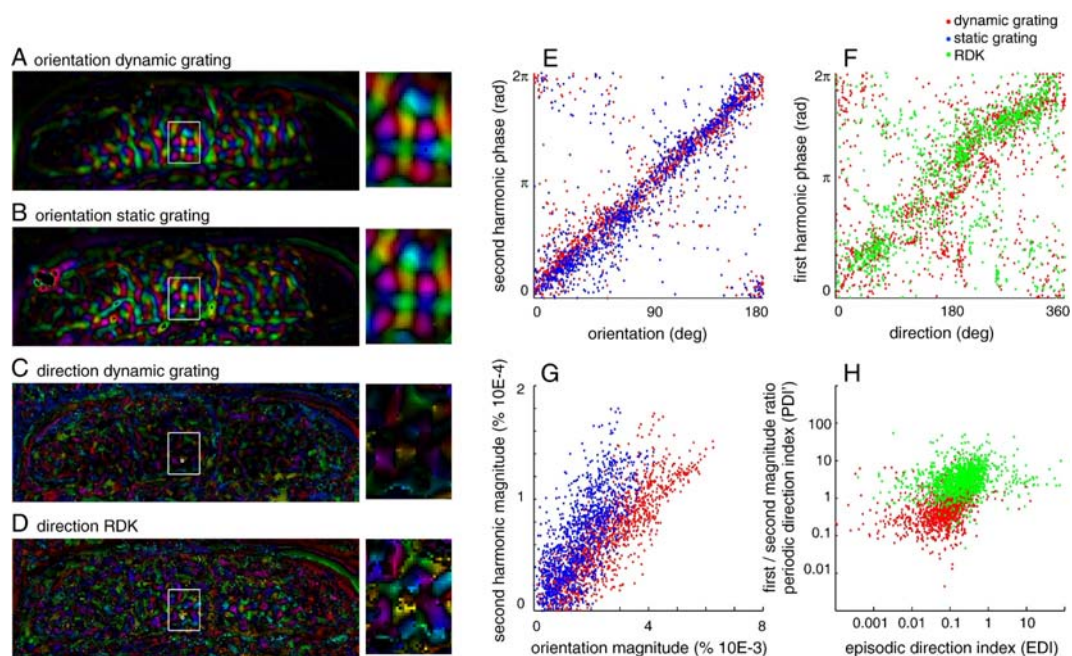


Figure 4. Maps from episodic paradigm and Von Mises Fitting in the same region of interest as in Figure 3. (A and B) Preferred orientation normalized by the amplitude for dynamic and static gratings. (C and D) Preferred direction normalized by the direction index EDI for dynamic grating and RDK. (E) Phase at the second harmonic (Figure 3, panel C) as a function of the preferred orientation for static and dynamic gratings (panels A and B). (F) Phase at the first harmonic (Figure 3, panels B) as a function of the preferred direction for dynamic grating and RDK (panels C and D). (G) Amplitude at the second harmonic (Figure 3, panels C) as a function of the orientation amplitude for static and dynamic gratings (panels A and B). (H) PDI's (Figure 3, panels D) as a function of the direction index (EDI) (panels C and D). Representation is in logarithmic scale.

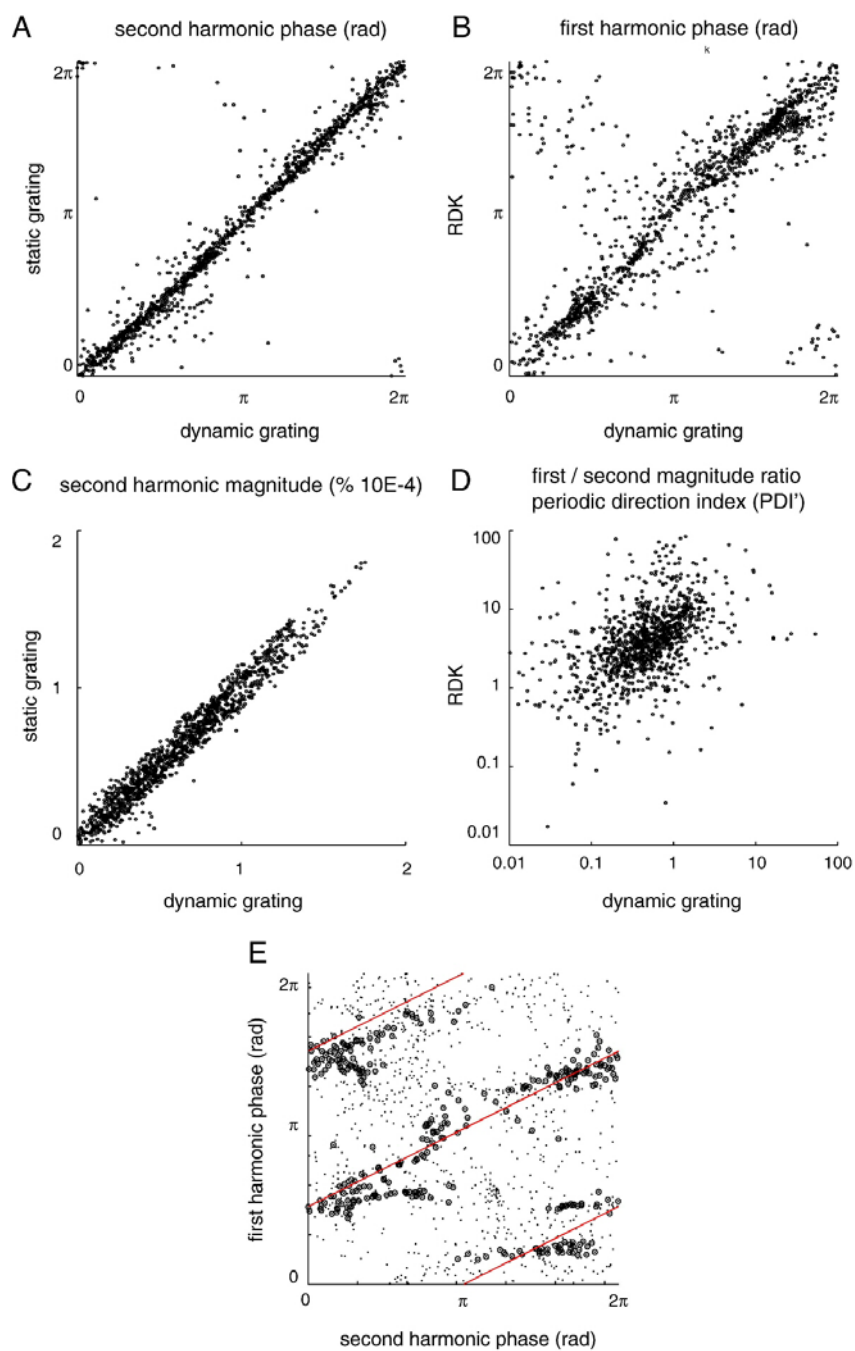


Figure 5. Scatter plots illustrating the relationship between: (A) Second harmonic phases for static and dynamic gratings in a region of interest indicated by the white boxes in Figure 3. (B) First harmonic phases for dynamic grating and RDK. (C) Harmonic amplitudes for static and dynamic gratings. (D) PDI's for dynamic grating and RDK. (E) First harmonic and second harmonic phases for dynamic grating, for all pixels (points) and pixels corresponding to high first harmonic amplitude and low phase gradient (circle, see method for gradient).

Fractures in direction map

Considering the phase of the first harmonic as an evaluation of the preferred direction map, we examined its relationship with the direction selectivity map PDI' (Figure 6). As explained in panel A, the hypothesis was that, in fractures revealed by a 2D-gradient (rate of change; (Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003)) direction selectivity is expected to be low. This should provoke a decrease of the first harmonic associated with direction without affecting the second, which is associated with orientation. The phase of the first harmonic (panel B) was used to calculate the 2D-gradient (panel C) as previously computed in previous studies (Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003). A high gradient was associated with high variations of the direction preference. The relationship between gradient and PDI' (panel D) in regions of interest indicated by white boxes (and their magnification) is presented in panel E. An inverse relationship is observed, meaning that high gradients (i.e. fractures) are associated with low direction selectivity, as previously stated. The decrease of the PDI' was caused by a reduction of first harmonic, while the second remained constant, i.e. without an effect on orientation response, as shown in panel F (PDI' = 0.6 in domains and 0.2 in fracture locations). These results were obtained with a dynamic grating but the same observation was made with RDK (data not shown).

Measures of direction selectivity

To further demonstrate that PDI' can be used to evaluate direction selectivity, the temporal frequency of the grating direction was modified (Figure 7). Neurons in area 18 exhibit temporal frequency tuning that should be detectable with optical imaging. Panel A presents the spectra obtained for different temporal frequencies. No peak at the first harmonic was observed at 0 Hz because no direction component was present (static grating). At 2, 4 and 6 Hz, the first harmonic can be used to calculate the PDI' shown in panel B. Despite the limited number of temporal frequencies tested, a temporal frequency tuning curve can be distinguished with a maximum PDI' between 2 and 4 Hz. Table 2 shows that there was no differences in the pattern of the maps across temporal frequencies (maps not shown).

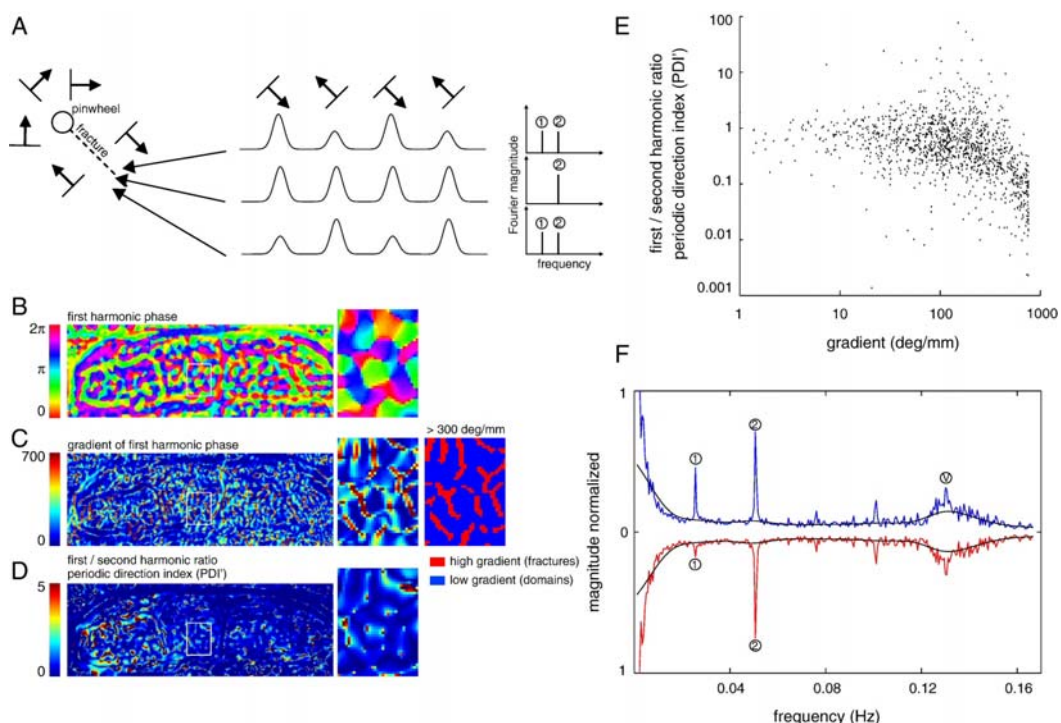


Figure 6. (A) Diagram of the estimated response profile in the direction map. Under fracture, the direction selectivity is reduced causing a decrease at the first harmonic. (B) Phase of the first harmonic for a dynamic grating (from panel B2 in Figure 3). (C) Gradient of the phase at the first harmonic. Note that the 2π range of phase was converted in 360 degrees of direction because gradient is a relative computation, unaffected by the non-correction of the hemodynamic delay. The second right magnification is the location of fracture (in red) and direction domains (in blue) with an arbitrary threshold of 300 deg/mm. (D) map of first / second harmonic ratio (PDI'). (E) Scatter plot of the PDI' as a function of the gradient in logarithmic scale. (F) Average spectra in pixels of fracture (red) and domains (blue) indicated in panel C.

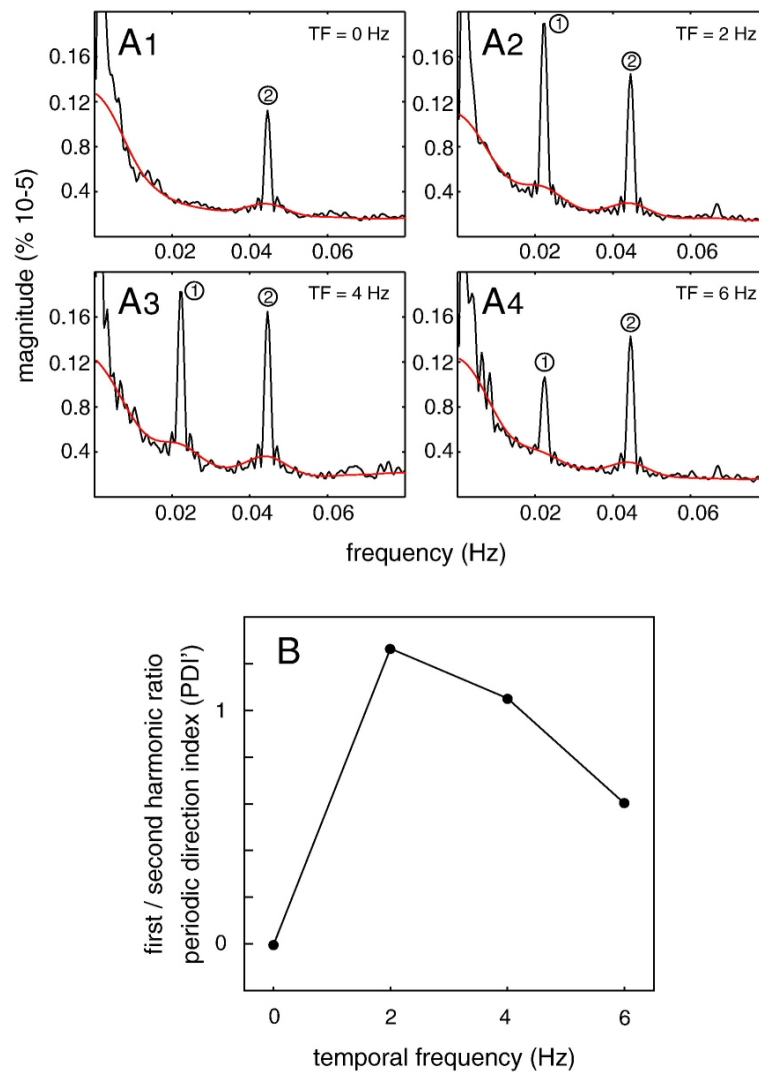


Figure 7. (A) Spectra recorded in area 18 of case 2 for a grating drifting at four temporal frequencies: 0, 2, 4 and 6 Hz (velocities: 0, 13, 27 and 40 deg/s). Stimulus frequency (rotation) was 0.022 Hz (1/45s). (B) PDI' measured from panel A as a function of temporal frequency.

	0 vs 2	0 vs 4	0 vs 6	2 vs 4	4 vs 6	2 vs 6
	Hz	Hz	Hz	Hz	Hz	Hz
Orientation (2 nd harmonic)	0.81	0.74	0.77	0.92	0.89	0.91
Direction (1 st harmonic)	-0.07	-0.07	0.05	0.87	0.78	0.72

Table 2. Correlation coefficients (r) between phase maps as a function of the temporal frequency.

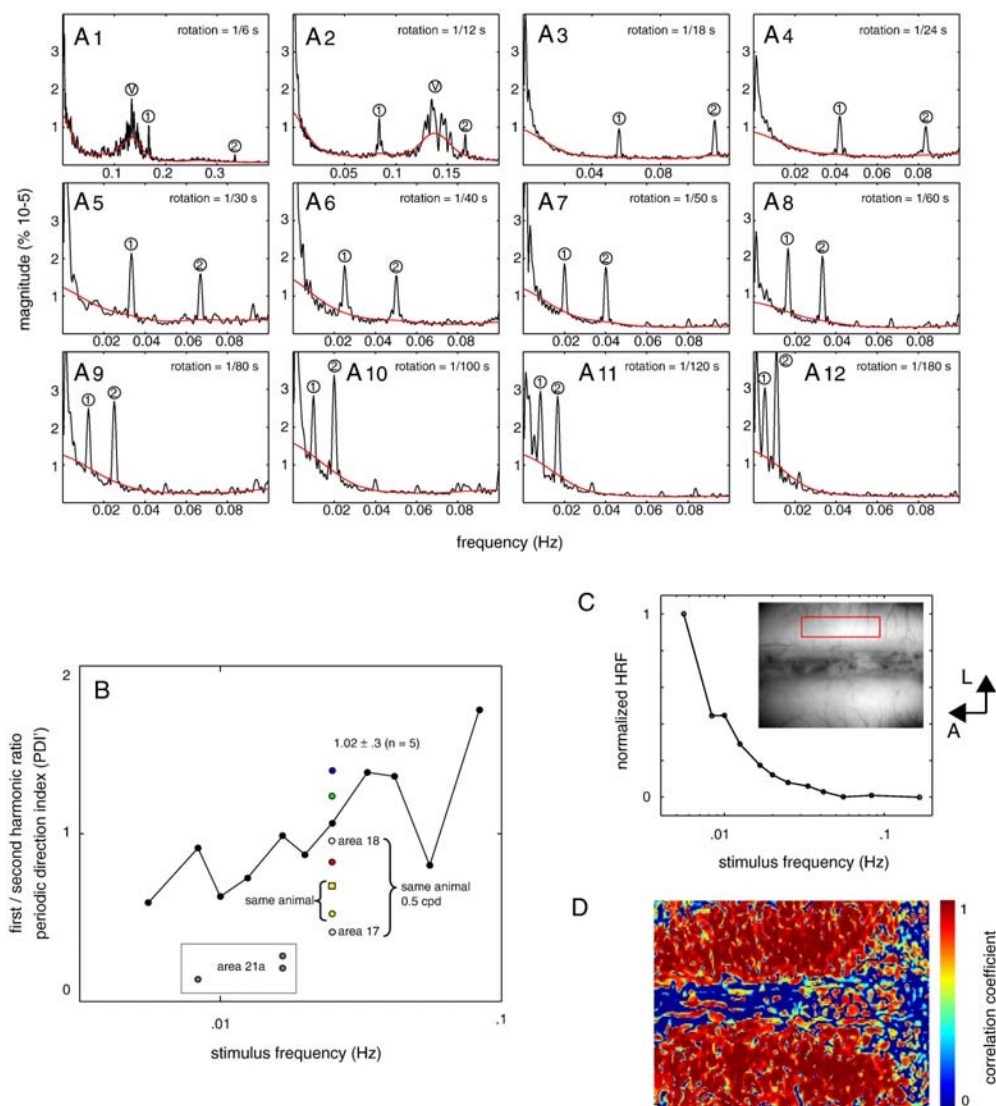


Figure 8. (A) Spectra recorded for 12 stimulus frequencies (Hz): 0.167, 0.083, 0.056, 0.042, 0.033, 0.025, 0.020, 0.017, 0.012, 0.010, 0.008 and 0.006 (in sec: 1/6, 1/12, 1/18, 1/24, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/80, 1/100, 1/120 and 1/180). (B) PDI' measured from panels A as a function of the stimulus frequency (from case 2, in logarithmic scale). Coloured points (red, green and blue) indicate PDI's measured in area 18 of cases 4 to 6 at the same stimulus frequency (0.025 Hz). Yellow points are the measurements for the dynamic grating shown in Figure 3 (case 1, circle: counter-clockwise stimulation, square: clockwise stimulation). The mean (\pm SD) is indicated in the Figure. Gray points are the measures in area 21a shown in Figure 9 (case 3, frequency = 0.008 and 0.017 Hz). White points are measures in area 17 and 18 shown in Figure 9 for a 0.5 c/deg dynamic grating (case 1). (C) Spectral distribution of the HRF obtained from the second harmonic signals (shown in panels A) in a ROI (red box in inset). (D) Correlation coefficients between the normalized HRF profile of each pixel and the reference profile shown in panel C.

The range of stimulus frequencies to assess the PDI' was evaluated with a dynamic grating (Figure 8). Since the signal in optical imaging is a weighting of the neuronal response and HRF (see Figure 1), and that the HRF is delimited in the frequency space (i.e. low frequency band), the magnitude of the harmonics should be influenced by the stimulus frequency. The responses for different stimulus frequencies, ranging from 0.006 Hz to 0.167 Hz, were evaluated (panel A). In every case, the first and the second harmonics could be discriminated and it was possible to calculate the PDI' (panel B). The optimal range of stimulus frequencies, defined by having a signal to noise ratio greater than two, was located between ~ 0.01 Hz and ~ 0.05 Hz. At higher frequencies, the second harmonic is filtered by the HRF and/or can be influenced by vasomotor waves (present at 0.1 Hz). At lower frequencies, the first harmonic can be affected by slow fluctuations (i.e. DC components clearly visible under 0.02 Hz) and noise due to the poor number of repetitions in a delimited recording time. Panel C shows an example of the HRF profile obtained from the data presented in panels A. The domain of frequency associated with the orientation mapping signal was localized in the lower range of frequencies (less than 0.04 Hz; low-pass profile). In contrast, we previously showed that the HRF for global activation had a band-pass profile, localized around 0.1-0.15 Hz (Vanni et al., submitted). The homogeneity of the HRF profile was compared for every pixel (panel D) and exhibited uniformity throughout the cortex, in accordance with our previous findings. Consequently, according to Eq. 6, the variations of PDI' do not come from a change in the HRF, but rather from neuronal properties (i.e. direction selectivity).

Despite some variability in the measures, the PDI' can be a reliable measure of the differences in direction selectivity across cortical areas or after experimental manipulations (e.g., pharmacological modulation). This is demonstrated in Figure 9 where the PDI' was used to evaluate and compare direction selectivity in brain areas along the dorsal and ventral pathways (Figure 9, panel A). In comparison to area 18, areas 17 and 21a are considered to be involved in form (i.e. orientation) rather than motion analysis (direction). Panel B shows the spectrum of the response recorded in area 21a, a high-order

area of the ventral stream where orientation domains are present with low direction selectivity (Huang et al., 2006; Villeneuve et al., 2009). Panel C displays the first and the second harmonic maps and no evidence of activation at the first harmonic could be observed. However, orientation domains were present at the second harmonic. This orientation map was validated by recordings with episodic paradigm (data not shown). PDI' of the experiment reported here was 0.1 (stimulus frequency = 0.008Hz, spatial frequency of the grating: 0.2c/deg, temporal frequency: 3Hz). Similar low values were reported in other stimulus condition (PDI' = 0.2 and 0.3 for a stimulus frequency of 0.017Hz, spatial frequency of the grating: 0.1c/deg, temporal frequency: 4Hz, maps and spectra not shown). Values of PDI' were always lower than those in area 18 (see grey points in Figure 8, panel B).

Panel D shows the spectra of the response recorded in area 17 and 18 for dynamic gratings with parameters set to optimally activate area 17 neurons (stimulus frequency = 0.025Hz, spatial frequency of the grating: 0.5c/deg, temporal frequency: 3Hz). Despite the fact that the spatial frequency used was not optimal for neurons in area 18, a strong response at the first harmonic relative to the second was observed (PDI' = 1) in comparison to that found in area 17 (PDI' = 0.4 and see white points in Figure 8, panel B). Similar results were observed in other experiments but in some cases, differences of PDI' between areas 17 and 18 were smaller (data not shown). Panels E1 and E2 show the response at the first and the second harmonics and reveal the reduced response at the first harmonic in area 17 (e.g., when compared to area 18 in panels B3 and C3 of Figure 3). Note that the scale of magnitude displayed was optimized to appreciate the whole range of signal amplitude in area 17 preventing then a clear observation of the low signals present in area 18 in this condition of stimulation.

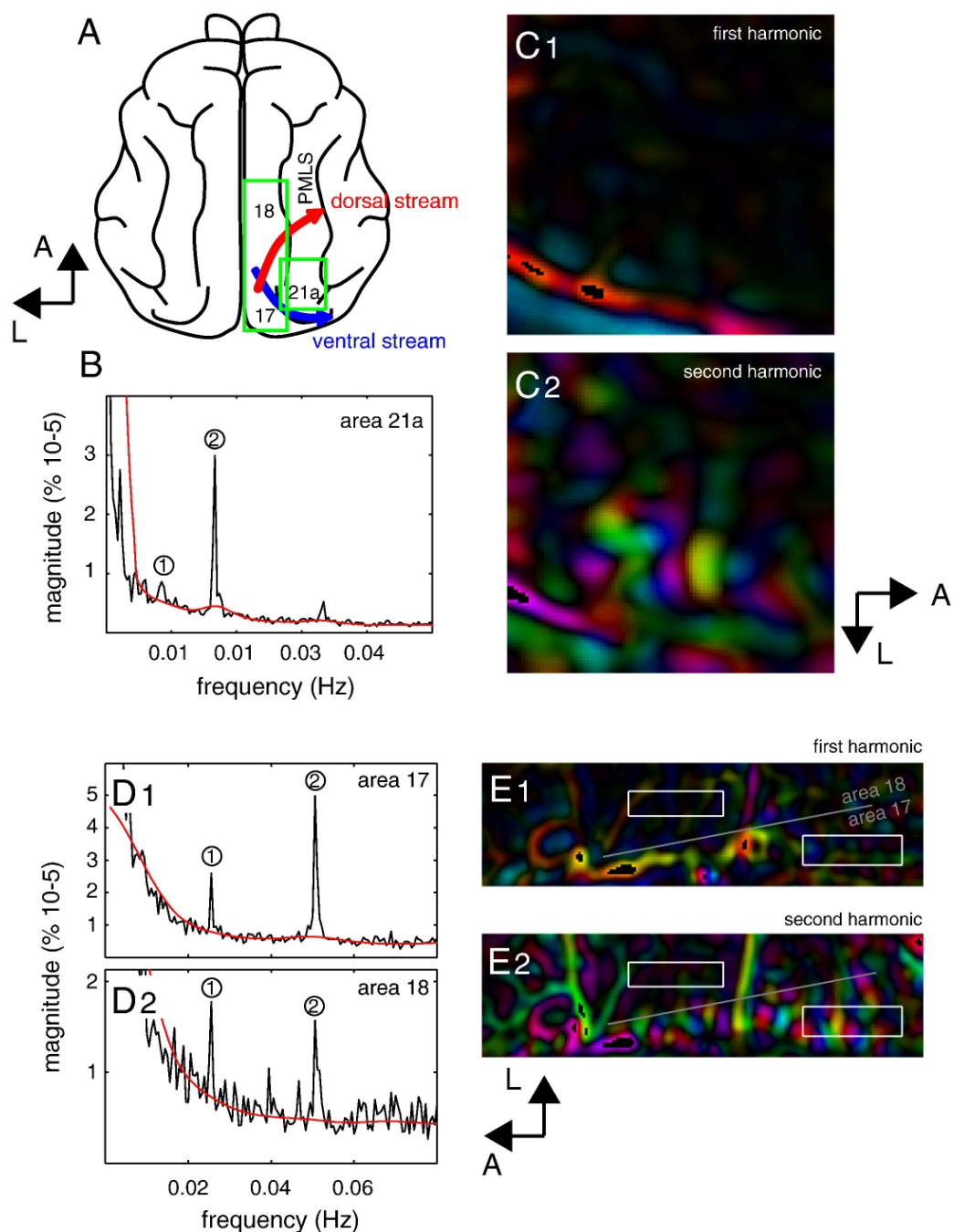
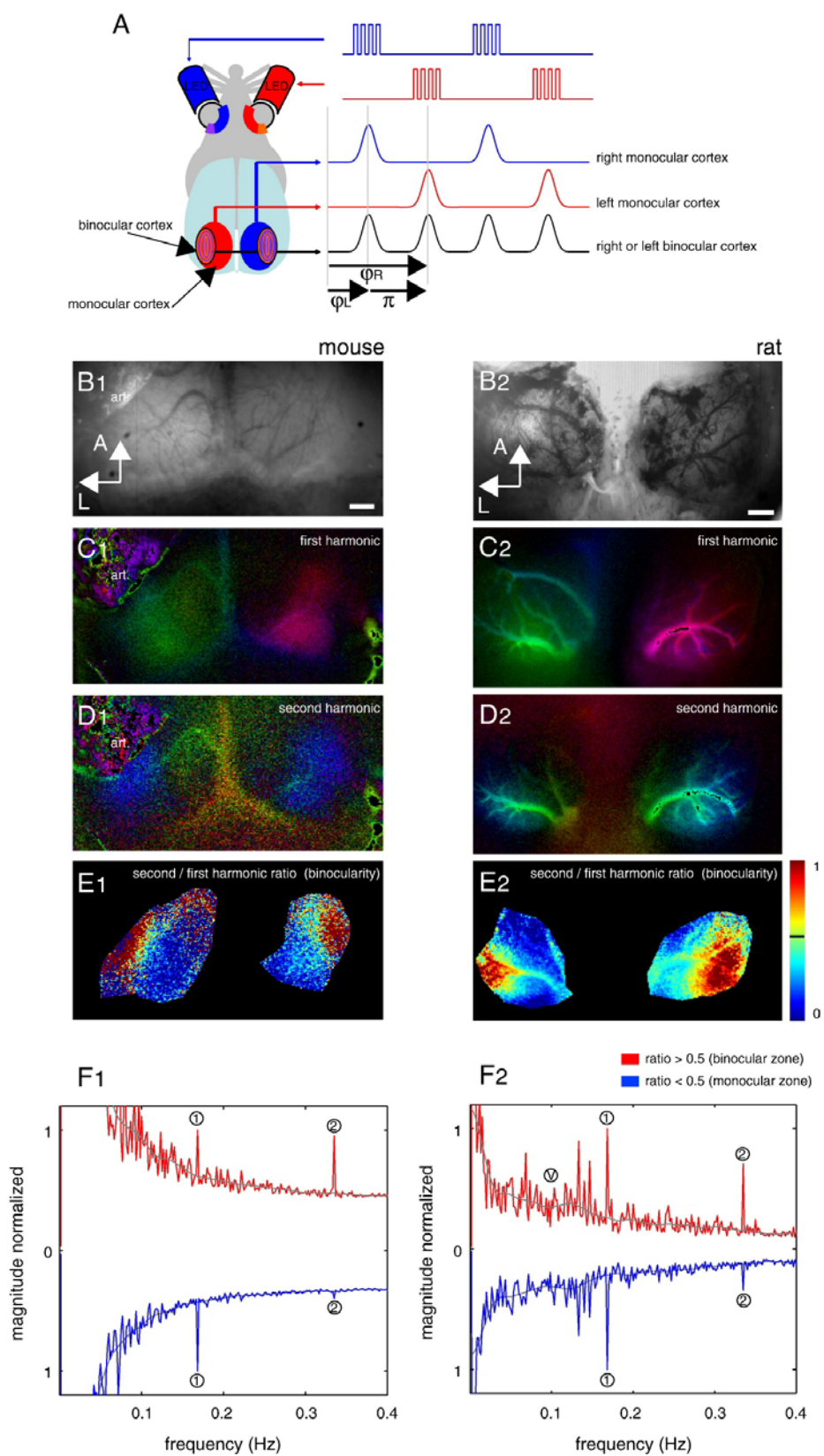


Figure 9. (A) Diagram of the cat brain cortex where the ventral and dorsal streams are displayed, inspired from (Lomber, 2001). (B) Spectrum recorded in area 21a of case 3. (C) Phase map normalized by amplitude map at the first (C1) and second harmonic (C2). (D) Spectrum recorded in area 17 and 18 for a dynamic grating (0.5 c/deg, 3Hz). (E) Phase map normalized by amplitude map at the first (E1) and second harmonic (E2). ROI for quantification of the spectra in areas 17 and 18 are indicated by white boxes.

Demonstration of versatility of the bimodal modulation: measures of monocular and binocular responses

The principle of bimodal modulation for direction selectivity in cats was exploited to map other parameters such as the “binocular selectivity” of the visual cortex in rodents (Figure 10). In this animal order, each eye is indirectly connected to the contralateral monocular cortex (Adams and Forrester, 1968; Cang et al., 2005; Drager, 1975; Gias et al., 2005; Kalatsky and Stryker, 2003; Mangini and Pearlman, 1980; Schuett et al., 2002; Wagor et al., 1980). However, parts of the retinopetal projections, associated with the frontal visual field, are ipsilateral and project to the binocular region of the cortex (panel A). In this experiment, LEDs were used to stimulate each eye in an alternate fashion. Responses were expected to be unimodal in the monocular part of the cortex and bimodal in the binocular area (i.e. patterns similar to “high” and “low direction selectivity” in Figure 1, respectively). This was tested on mice (panels 1) and rats (panels 2). Panels C display the responses at the first harmonic. Activations of the visual cortex were clearly visible in both animals with two distinct phases corresponding to the activation of each eye (i.e. green and magenta colors). Panels D display the responses at the second harmonic. Activations were also clearly visible and slightly lateral. The phase was homogeneous throughout both hemispheres because the LED stimulus equally activates each binocular cortex. These results provide evidence that the second harmonic is linked to binocular information whereas the first harmonic carries monocular information. The ratio of the second to first harmonics was used to reveal the degree of “binocularity”. This ratio was computed in regions where activation was visible (ROI highlighted in panels E). As previously assumed, a high ratio (i.e. high “binocularity”) was present in the lateral part of the visual cortex in both species. The spectra presented in panels F show the ratio in both species (1.2 (mouse) and 0.7 (rat) in the binocular zones and 0.1 (mouse) and 0.3 (rat) in monocular zones).



(légende de la page précédente)

Figure 10. (A) Diagram of the visual projections in rodents. Monocular visual cortex of each hemisphere receives information from the contralateral eye. Binocular visual cortex, lateral to the monocular parts, receive information from both eyes and are associated with a field of view in the front of the animal. White LED was fitted on the corneas and stimulated each eye in an alternate manner. Binocular regions are activated for each LED stimulation instead of monocular regions. (B) Vasculature pattern in the region of interest on the visual cortex of mouse (panels 1) and rat (panels 2). Scale bar = 1mm, Art.: artefact. (C and D) Phase map normalized by amplitude map at the first and the second harmonics. Stimulus frequency was 0.167 Hz (1/6s). (E) Ratio of the second / first harmonic maps. (F) Average spectra in pixels of high ratio (> 0.5 , in red) and low ratio (< 0.5 , in blue) in a region of interest delimited in panel E.

DISCUSSION

This study indicated that, in combination with continuous stimulation, first and second harmonics of the Fourier decomposition of optical signals can be successfully used to reveal direction selectivity. While the phase and magnitude of the second harmonic were associated with orientation components (i.e. preferred orientation and strength), the phase of the first harmonic was driven by the preferred direction. The observations reported in this paper confirm that under appropriate conditions, the ratio of the first / the second harmonics can be used as an evaluation of the direction selectivity similar to a “direction index” in an episodic paradigm. These results are thus in accord with those obtained from episodic paradigms but can be obtained in shorter recording sessions.

The ratio of the first / the second harmonic, named uncorrected periodic direction index (PDI') in the present study, was measured in area 18 using both gratings and RDK. The quantification of PDI' was observed to vary with the grating's temporal frequency and was greater with RDK. The PDI' was small in fractures of preferred direction maps corresponding to low direction selectivity loci. The PDI' was also smaller in areas of the ventral pathway that are less implicated in direction selectivity, such as areas 17 and 21a.

Finally, bimodal modulation was used to reveal the binocular selectivity of the visual cortex of rats and mice. Unimodal and bimodal responses were

associated with first and second harmonics respectively and the ratio of the second / first harmonic could be used as a measure of “binocularity”.

Periodic stimulation

Combining continuous recording and spectral decomposition represents a powerful method given that the optical signal can be easily discriminated from periodic physiological noise: heartbeat (~3 Hz), respiration (~0.5 Hz) and vasomotion (~0.1 Hz in (Mayhew et al., 1996), ~0.14 Hz in the present study). The recording time is thus considerably reduced. This approach has proved to be successful for acquiring clear orientation maps in very short sessions either by optical imaging (in the order of minutes; present study, (Jha et al., 2005; Kalatsky and Stryker, 2003; Zepeda et al., 2004)) or other modalities such as fMRI (Fukuda et al., 2006; Moon et al., 2007). Nevertheless, the low-frequency domain of the HRF requires stimulating at slow frequencies (between 0.01 Hz and 0.05 Hz) and it is preferable to use a recording time longer enough to have a sufficient number of repetitions to discriminate the first harmonic. To estimate direction, associated with the first harmonic, 10 to 30min of recording was found to be appropriate (this is 6 to 20 times shorter than with episodic paradigms). Thus the continuous paradigm represents a powerful method for studying the impact of experimental manipulations on cortical functioning. For example, it could be used to investigate the feedback influences of high-level areas on orientation and direction selectivity in primary areas by rapid and reversible pharmacological deactivation of the projecting area (Galuske et al., 2002; Huang et al., 2004; Liang et al., 2007; Shen et al., 2008). It could also be a powerful tool to measure neurons' visual functions which necessitates a large number of conditions such as contrast sensitivity functions.

Despite the spectral decomposition, 2D-noise contributions are present in harmonics related to the stimulus. Here, a spatial band-pass filtering has been applied to each frame of the recording prior to the Fourier transform (Fukuda et al., 2006; Jha et al., 2005). This method of noise reduction presumes an “a priori” knowledge of the spatial pattern of domains and can modify quantifications (Ribot et al., 2006; Villeneuve et al., 2009). This is not likely

the case as (Swindale et al., 2003) demonstrated that smoothing (i.e. low-pass filtering) does not significantly affect the pattern of orientation maps .

Information carried by harmonics

As in previous studies (Jha et al., 2005; Kalatsky and Stryker, 2003; Zepeda et al., 2004), second harmonic information was exploited to reveal orientation components with both static and dynamic gratings. The innovative aspects of the present study are the demonstration that the first harmonic can be used to reveal direction and that the ratio of the magnitude of the first to the second harmonic (PDI') represents a powerful measure of direction selectivity. Indeed, this ratio informs about the selectivity of the response to one direction in comparison with the opposite. Nonetheless, as shown in Eq. (6), this ratio (PDI') is not a direct measure of the direction selectivity (PDI) as used in (Swindale et al., 2003). To have the exact value, HRF factors must be introduced by canonical estimation or physiological evaluation (Vanni et al., submitted). Despite this issue, the PDI' is appropriate in studies where hemodynamic components are not expected to change (e.g. pharmacological and cooling inactivation).

As previously described, the phase of the first and second harmonics can also be used to reveal direction and orientation preferences. As expected, an orthogonal relationship between orientation and direction was observed (Henry et al., 1974; Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Ribot et al., 2008; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003). While periodic stimulation is known to have a better SNR (Kalatsky and Stryker, 2003), the orthogonal relationship was considerably noisier than that found with Von Mises fitting. A possible explanation is that the first and second harmonics alone do not provide an exact evaluation of the preferred direction and orientation. More precisely, a first possibility is that higher harmonics, related to the shape of the response, should be considered (see third and fourth harmonics in Figure 2, panel B3). This is also in accordance with (Swindale, 1998) who concluded that the cosine function does not fit very well to the orientation tuning function. The cosine function is indeed the function used in “vector sums” as well as Fourier

decomposition when restricted to the first harmonic. Regardless, (Worgotter and Eysel, 1987) reported that higher harmonics contribute only remotely to the shape of the polar plot. A second possibility is that the signal at the first harmonic with a dynamic grating is the consequence of both preferred and anti-preferred responses (See Eq. 6 of the model). Indeed, while the response in the preferred direction dominates the phase at the first harmonic it could be contaminated by the anti-preferred direction response. However, the relationship remained noisy when the phase of the first harmonic of a RDK (i.e. to minimize the anti-preferred response) was compared to the phase of the second harmonic of a static grating (i.e. to eliminate the direction response). A third possibility is that the model assumes orientation to be truly orthogonal to direction but this relationship may not be as rigid. In the future, bimodal modulation would benefit from implementing and validating a model exploiting higher harmonics.

Despite the above statements, a good correspondence was observed between the present periodic paradigm and previous episodic ones, regardless of the controversies about direction estimation (Kim et al., 1999; Kisvarday et al., 2001; Ribot et al., 2008; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003). The Fourier transform on episodic electrophysiological data described in (Worgotter and Eysel, 1987) does not exploit the main advantage of the periodic paradigm: i.e. the discrimination of periodic responses from noise. Moreover, the long recording session in episodic paradigms requires minimizing the number of conditions. For example, orientation maps were often constructed from only four orientations whereas more than eight would be needed to obtain a reliable assessment of orientation selectivity (Womelsdorf et al., 2001). Such requirement would be met in a periodic paradigm where an infinite number of stimuli are presented (Kalatsky and Stryker, 2003).

Direction selectivity

Area 18 is located along the dorsal stream and is implicated in motion and depth perception (Lomber, 2001; Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al.,

2003). In this study, we have compared direction selectivity measures in area 18 with those obtained in areas of the ventral stream (area 17 and 21a) which are known to be preferentially involved in form rather than motion perception (Lomber, 2001; Villeneuve et al., 2009). Such comparison was never based on optical imaging data and it offered us the opportunity to evaluate the sensitivity of our paradigm in assessing direction in areas with low directional preferences. The PDI's measured in area 21a were always weaker than those in area 18. This is in accordance with previous optical imaging studies which showed that only orientation maps are present in area 21a (Huang et al., 2006; Villeneuve et al., 2009), and with electrophysiological findings which indicate a low direction selectivity of area 21a neurons (Dreher et al., 1993). A smaller PDI' was also reported in area 17 in comparison to area 18 but the difference was less than that observed between areas 21a and 18. This may be due to the fact that, at the level of area centralis representation, the number of direction selective cells and their direction selectivity is greater in area 18 than in 17 (Orban et al., 1981). However, the differences between the two areas is not considerable and may stem from the fact that the portion of area 17 accessible through the craniotomy was very small and could correspond to areas 17-18 transition zone where optical direction properties can be "hybrid" (Ohki et al., 2000; Rochefort et al., 2007). One may also suggest that the HRF may be different in area 17 and 18, affecting the harmonic distribution and thus the PDI'. However, as shown here and in (Vanni et al., submitted), the HRF is uniform throughout the primary visual cortex.

The pattern of direction selectivity was also evaluated across area 18 and compared between domains and singularities. The amplitude of the second harmonic was low near orientation singularities (pinwheels), revealing a weaker orientation response as previously described (Swindale et al., 2003). Furthermore, the PDI' was found to be lower in direction singularities (fractures). This is in agreement with previous reports in optical imaging showing low direction selectivity in fracture locations in optical imaging (Shmuel and Grinvald, 1996; Swindale et al., 2003) and at cellular levels (Ohki et al., 2005).

Special attention is needed with respect to the rotational nature of the paradigm. An additional and artifactual velocity is present which varies as a function of the eccentricity of the rotation. This artifactual velocity is defined as $V_a = 2\pi EF$ where E is the eccentricity in degrees and F is the frequency of rotation in Hz. For example, V_a was 1.6 deg/s at 10 deg of eccentricity for a frequency of 0.025 Hz (1/40s). When the spatiotemporal parameters of the grating presented was optimal for area 18 (0.15 c/deg, 4Hz) the velocity of the stimulus was 26.6 deg/s and the artifactual velocity was negligible (6% of variation at 10 deg of eccentricity). In contrast, when parameters were optimal for area 17 (0.5 c/deg, 2Hz) the velocity of the stimulus was 4 deg/s and the artifactual velocity affected the homogeneity of the stimulus speed (40% of variation). This means that, at 10 deg of eccentricity, the apparent velocity was 2.4 deg/s and was, in the opposite position, 5.6 deg/s. Thus one should reduce the frequency of rotation to minimize this effect. We showed that excellent direction quantification can be obtained down to 0.01 Hz (1/100s).

Binocularity

Given the success of the bimodal modulation in evaluating direction selectivity, the technique was adapted for the assessment of the binocular / monocular areas of the primary visual cortex in rodents. Clearly, the first harmonic of the signal was related to the monocular response, and the second to the binocular response. Here again, the ratio of the second to first harmonics can be used as a measure of “binocularity” (i.e. tendency to respond equally to both eyes). This measure is similar to the ratio $(C-I)/(C+I)$ described in (Cang et al., 2005) but the present method has the advantage of stimulating the whole retina of both eyes during the same recording session, reducing the contribution of physiological variations between two recording sessions. However, as stated in the model, our ratio is not a direct evaluation of $(C-I)/(C+I)$ because of the weighting by the HRF. Nevertheless, the second to first harmonic ratios can be used to delineate binocular and monocular zones and study their relative sized after experimental manipulations such as monocular light deprivation. Our results are in agreement with the binocular / monocular mappings in the visual

cortex of mice (Cang et al., 2005; Drager, 1975; Kalatsky and Stryker, 2003; Mangini and Pearlman, 1980; Schuett et al., 2002; Wagor et al., 1980) and rats (Adams and Forrester, 1968; Gias et al., 2005). The visual cortex has a large monocular zone (related to the contralateral eye) surrounded laterally by binocular zones displaying a preference for the contralateral eye. An alternative approach could be the stimulation of both eyes with distinct frequencies, with the assumption of linearity of response of the Fourier transform (Kalatsky et al., 2006; Vanni et al., submitted). In that case, the responses at both frequencies are the combination of the neuronal responses and the HRF, the latter contributing differently at each frequency (see Figure 1). Therefore, the use of this alternative approach necessitates the characterisation of the HRF to normalize the responses.

Conclusions

This work presents evidence that bimodal modulation in periodic stimulation can be used to evaluate direction selectivity and that it can be exported to other properties such as binocularity. This new paradigm could be adapted to other visual modalities such as color coding or retinal disparity and to the investigation of multisensory processing (e.g. visual vs. auditory input). In the future, this paradigm could be translated to other optical imaging modalities aimed at the investigation of the visual cortex organization, such as autofluorescence flavoprotein imaging, voltage sensitive dyes, laminar optical tomography or in vivo two photon microscopy, (Blasdel, 1992; Hillman et al., 2007; Husson et al., 2007; Ohki et al., 2005). Exportation to high resolution fMRI is also easily conceivable (Fukuda et al., 2006; Moon et al., 2007).

REFERENCES

- Adams, A.D., Forrester, J.M., 1968. The projection of the rat's visual field on the cerebral cortex. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 53, 327-336.
- Blasdel, G.G., 1992. Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. *J Neurosci* 12, 3115-3138.
- Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1991. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature* 353, 429-431.
- Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1996. Optical imaging based on intrinsic signal-the methodology. In A. W. Toga and J. C. Mazziotta (Eds) *Brain Mapping: The Methods*.
- Cang, J., Kalatsky, V.A., Lowel, S., Stryker, M.P., 2005. Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci* 22, 685-691.
- Drager, U.C., 1975. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 160, 269-290.
- Dreher, B., Michalski, A., Ho, R.H., Lee, C.W., Burke, W., 1993. Processing of form and motion in area 21a of cat visual cortex. *Vis Neurosci* 10, 93-115.
- Dunn, A.K., Devor, A., Dale, A.M., Boas, D.A., 2005. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage* 27, 279-290.
- Everson, R., Knight, B.W., Sirovich, L., 1997. Separating spatially distributed response to stimulation from background. I. Optical imaging. *Biol Cybern* 77, 407-417.
- Fekete, T., Omer, D.B., Naaman, S., Grinvald, A., 2009. Removal of spatial biological artifacts in functional maps by local similarity minimization. *J Neurosci Methods* 178, 31-39.
- Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., Grinvald, A., 1990. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6082-6086.
- Fukuda, M., Moon, C.H., Wang, P., Kim, S.G., 2006. Mapping iso-orientation columns by contrast agent-enhanced functional magnetic resonance imaging: reproducibility, specificity, and evaluation by optical imaging of intrinsic

- signal. *J Neurosci* 26, 11821-11832.
- Gabbay, M., Brennan, C., Kaplan, E., Sirovich, L., 2000. A principal components-based method for the detection of neuronal activity maps: application to optical imaging. *Neuroimage* 11, 313-325.
- Galuske, R.A., Schmidt, K.E., Goebel, R., Lomber, S.G., Payne, B.R., 2002. The role of feedback in shaping neural representations in cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17083-17088.
- Gias, C., Hewson-Stoate, N., Jones, M., Johnston, D., Mayhew, J.E., Coffey, P.J., 2005. Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage* 24, 200-206.
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., Wiesel, T.N., 1986. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324, 361-364.
- Henry, G.H., Bishop, P.O., Dreher, B., 1974. Orientation, axis and direction as stimulus parameters for striate cells. *Vision Res* 14, 767-777.
- Hillman, E.M., Devor, A., Bouchard, M.B., Dunn, A.K., Krauss, G.W., Skoch, J., Bacskai, B.J., Dale, A.M., Boas, D.A., 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *Neuroimage* 35, 89-104.
- Huang, L., Chen, X., Shou, T., 2004. Spatial frequency-dependent feedback of visual cortical area 21a modulating functional orientation column maps in areas 17 and 18 of the cat. *Brain Res* 998, 194-201.
- Huang, L., Shou, T., Chen, X., Yu, H., Sun, C., Liang, Z., 2006. Slab-like functional architecture of higher order cortical area 21a showing oblique effect of orientation preference in the cat. *Neuroimage* 32, 1365-1374.
- Husson, T.R., Mallik, A.K., Zhang, J.X., Issa, N.P., 2007. Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci* 27, 8665-8675.
- Jha, S.K., Jones, B.E., Coleman, T., Steinmetz, N., Law, C.T., Griffin, G., Hawk, J., Dabbish, N., Kalatsky, V.A., Frank, M.G., 2005. Sleep-dependent plasticity requires cortical activity. *J Neurosci* 25, 9266-9274.
- Kalatsky, V.A., O'Connor, E.M., Tcheslavski, G.V., Kalatsky, V., 2006. Concurrent multidimensional imaging of visual space representations in mouse

visual cortex by Fourier optical imaging of intrinsic signals. SfN abstract prog. 503.9.

Kalatsky, V.A., Stryker, M.P., 2003. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38, 529-545.

Kim, D.S., Matsuda, Y., Ohki, K., Ajima, A., Tanaka, S., 1999. Geometrical and topological relationships between multiple functional maps in cat primary visual cortex. *Neuroreport* 10, 2515-2522.

Kisvarday, Z.F., Buzas, P., Eysel, U.T., 2001. Calculating direction maps from intrinsic signals revealed by optical imaging. *Cereb Cortex* 11, 636-647.

Liang, Z., Shen, W., Shou, T., 2007. Enhancement of oblique effect in the cat's primary visual cortex via orientation preference shifting induced by excitatory feedback from higher-order cortical area 21a. *Neuroscience* 145, 377-383.

Lomber, S.G., 2001. Behavioral cartography of visual functions in cat parietal cortex: areal and laminar dissociations. *Prog Brain Res* 134, 265-284.

Mangini, N.J., Pearlman, A.L., 1980. Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 193, 203-222.

Mayhew, J.E., Askew, S., Zheng, Y., Porrill, J., Westby, G.W., Redgrave, P., Rector, D.M., Harper, R.M., 1996. Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage* 4, 183-193.

Moon, C.H., Fukuda, M., Park, S.H., Kim, S.G., 2007. Neural interpretation of blood oxygenation level-dependent fMRI maps at submillimeter columnar resolution. *J Neurosci* 27, 6892-6902.

Nassim, M.Y., Vanni, M.P., Casanova, C., submitted. New Tools for Mapping the Rat Visual Cortex and Superior Colliculus by Optical Imaging. *Experimental Brain Research*.

Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C., 2005. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597-603.

Ohki, K., Matsuda, Y., Ajima, A., Kim, D.S., Tanaka, S., 2000. Arrangement of orientation pinwheel centers around area 17/18 transition zone in cat visual cortex. *Cereb Cortex* 10, 593-601.

Orban, G.A., Kennedy, H., Maes, H., 1981. Response to movement of neurons

- in areas 17 and 18 of the cat: direction selectivity. *J Neurophysiol* 45, 1059-1073.
- Ribot, J., Tanaka, S., O'Hashi, K., Ajima, A., 2008. Anisotropy in the representation of direction preferences in cat area 18. *Eur J Neurosci* 27, 2773-2780.
- Ribot, J., Tanaka, S., Tanaka, H., Ajima, A., 2006. Online analysis method for intrinsic signal optical imaging. *J Neurosci Methods* 153, 8-20.
- Rocheffort, N.L., Buzas, P., Kisvarday, Z.F., Eysel, U.T., Milleret, C., 2007. Layout of transcallosal activity in cat visual cortex revealed by optical imaging. *Neuroimage* 36, 804-821.
- Schuett, S., Bonhoeffer, T., Hubener, M., 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci* 22, 6549-6559.
- Shen, W., Liang, Z., Shou, T., 2008. Weakened feedback abolishes neural oblique effect evoked by pseudo-natural visual stimuli in area 17 of the cat. *Neurosci Lett* 437, 65-70.
- Shmuel, A., Grinvald, A., 1996. Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *J Neurosci* 16, 6945-6964.
- Sornborger, A., Sailstad, C., Kaplan, E., Sirovich, L., 2003. Spatiotemporal analysis of optical imaging data. *Neuroimage* 18, 610-621.
- Sornborger, A., Yokoo, T., Delorme, A., Sailstad, C., Sirovich, L., 2005. Extraction of the average and differential dynamical response in stimulus-locked experimental data. *J Neurosci Methods* 141, 223-229.
- Stetter, M., Schiessl, I., Otto, T., Sengpiel, F., Hubener, M., Bonhoeffer, T., Obermayer, K., 2000. Principal component analysis and blind separation of sources for optical imaging of intrinsic signals. *Neuroimage* 11, 482-490.
- Swindale, N.V., 1998. Orientation tuning curves: empirical description and estimation of parameters. *Biol Cybern* 78, 45-56.
- Swindale, N.V., Grinvald, A., Shmuel, A., 2003. The spatial pattern of response magnitude and selectivity for orientation and direction in cat visual cortex. *Cereb Cortex* 13, 225-238.
- Swindale, N.V., Matsubara, J.A., Cynader, M.S., 1987. Surface organization of orientation and direction selectivity in cat area 18. *J Neurosci* 7, 1414-1427.

- Tolhurst, D.J., Dean, A.F., Thompson, I.D., 1981. Preferred direction of movement as an element in the organization of cat visual cortex. *Exp Brain Res* 44, 340-342.
- Vanni, M.P., Provost, J., Lesage, F., Casanova, C., submitted. Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *J Neurosci Methods*.
- Vanni, M.P., Villeneuve, M.Y., Provost, J., Lesage, F., Casanova, C., 2007. Orientation and direction selectivity in the cat visual cortex by spectral decomposition of the optical imaging signals. *SfN abstract prog.* 920.11.
- Villeneuve, M.Y., Vanni, M.P., Casanova, C., 2009. Modular Organization in Area 21a of the Cat Revealed by Optical Imaging: Comparison with the Primary Visual Cortex. *Neuroscience* 164 1320–1333.
- Wagor, E., Mangini, N.J., Pearlman, A.L., 1980. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse. *J Comp Neurol* 193, 187-202.
- Womelsdorf, T., Eysel, U.T., Kisvarday, Z.F., 2001. Comparison of orientation maps obtained with different number of stimulus orientations. *Neuroimage* 13, 1131-1139.
- Worgotter, F., Eysel, U.T., 1987. Quantitative determination of orientational and directional components in the response of visual cortical cells to moving stimuli. *Biol Cybern* 57, 349-355.
- Yokoo, T., Knight, B.W., Sirovich, L., 2001. An optimization approach to signal extraction from noisy multivariate data. *Neuroimage* 14, 1309-1326.
- Zepeda, A., Arias, C., Sengpiel, F., 2004. Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods* 136, 1-21.

DISCUSSION

5. Sommaire des résultats

5.1 Cartes de modulation par le pourtour dans le cortex visuel primaire

La stimulation de portions circonscrites du champ visuel a permis d'activer les régions rétinotopiquement correspondantes dans le cortex visuel primaire du chat. En raison de la dispersion de la position des champs récepteurs, une surface correspondante à un petit stimulus correspondait à une aire de quelques millimètres dans le cortex. Cette surface était proportionnelle à la taille de la stimulation.

Dans l'aire d'activation évoquée par les plus petits stimuli, la sélectivité à l'orientation en fonction de la taille de la stimulation a alors été mesurée. Ainsi, la taille optimale évoquant la réponse la plus forte ainsi que la suppression de cette réponse optimale par la stimulation « plein écran » ont été calculées.

Dans trois quart des pixels, une suppression par le plein écran a été observée. La taille optimale mesurée était plus grande dans l'aire 18 que dans l'aire 17 et augmentait en fonction de l'excentricité du centre des stimulations visuelles. Ces résultats sont donc en accord avec le fait que la taille des champs récepteurs serait plus grande dans l'aire 18 que dans l'aire 17 et que leur taille augmenterait avec l'excentricité. Aucune différence dans la force de la suppression n'a pas contre été observée entre les aires 17 et 18.

L'aspect principal de cette étude était que les pixels présentant une suppression semblaient être organisés en domaines périodiques aussi bien dans l'aire 17 que dans l'aire 18. Ainsi l'existence d'une organisation modulaire pour la suppression semblerait exister au même titre que d'autres paramètres.

Il est également à noter que les frontières de ces modules de suppression semblaient coïncider avec les « pinwheels » de la carte d'orientation. Cette interaction spatiale entre les cartes de suppression et d'orientation irait donc à l'encontre du principe d'uniformité de recouvrement ou d'une co-localisation de forte suppression au niveau des pinwheels.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que les interactions centre / pourtour peuvent être quantifiée par l'imagerie optique et qu'elles semblent être organisées en domaines de basse et haute suppressions dans le cortex visuel primaire

du chat. Une telle organisation modulaire n'avait jusqu'ici été démontrée que dans une aire de plus haut niveau et chez les primates.

5.2 Cartes fonctionnelles dans l'aire 21a

La localisation anatomo-fonctionnelle de l'aire 21 par rapport au cortex visuel primaire (aires 17 et 18) a été rendue possible grâce à l'emploi d'une grande chambre d'enregistrement et de la cartographie de la fréquence spatiale optimale. Une organisation modulaire pour l'orientation y a été révélée et sa structure était similaire à celle observée dans les aires 17 et 18 enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales et sur les mêmes sujets. Mais, contrairement au cortex visuel primaire, aucune organisation pour la direction n'a pu être révélée ce qui supporte l'hypothèse que l'aire 21a serait plus impliquée dans la voie ventrale qui n'est pas prioritairement engagée dans l'analyse du mouvement.

Malgré son engagement dans la voie ventrale impliquant l'analyse précise des formes, la réponse à l'orientation était plus faible que dans le cortex visuel primaire. De plus, l'analyse indirecte de la largeur de bande n'a pas révélée de différence entre les aires corticales étudiées.

L'absence d'une organisation pour la direction n'a visiblement pas eu d'impact sur la structure générale de la carte d'orientation. La similarité des cartes d'orientation observée entre l'aire 21a et les aires 17 et 18 suggère également que la hiérarchie ne semble pas intervenir dans l'établissement de la structure des cartes fonctionnelles.

En conclusion, cette étude a principalement permis de révéler la présence de modules d'orientation en l'absence d'une quelconque organisation pour la direction au niveau de l'aire 21a du chat.

5.3 La stimulation continue pour révéler la réponse hémodynamique, la taille des champs récepteurs et la sélectivité à la direction

Le paradigme de stimulation continue, initialement développé chez la souris, a pu être utilisé avec succès pour révéler l'organisation rétinotopique du cortex visuel primaire chez le chat. Un modèle a alors été proposé pour établir la relation entre la réponse

optique enregistrée et les réponses neuronale et hémodynamique. Il a en effet été proposé que la réponse optique dans le domaine spectral correspondait à la réponse spectrale de l'activation neuronale, pondérée par le profil fréquentiel de la réponse hémodynamique.

Modèle d'évaluation de la réponse hémodynamique

Le profil fréquentiel de la réponse hémodynamique a pu être estimé en combinant les réponses de stimulations à différentes fréquences provenant de plusieurs enregistrements. Par la suite, nous avons proposé que la caractérisation de cette réponse hémodynamique puisse être incorporée dans le cadre d'un modèle inverse afin de pouvoir calculer la sélectivité neuronale à partir de la réponse optique. Toutefois, dans le cas où le profil de la réponse hémodynamique est identique en chaque point du cortex, la sélectivité neuronale pourrait malgré tout être mesurée avec confiance de manière relative sans l'incorporation du profil hémodynamique.

Modèle de réponse en fonction de la taille des populations de champs récepteurs et de la sélectivité à la direction

Lorsque l'activité neuronale correspondait à la réponse à une barre en mouvement périodique dans le champ visuel, du fait de la taille des champs récepteurs, la réponse neuronale pouvait être modélisée par une fonction gaussienne unimodale. Ainsi dans l'espace fréquentiel, le ratio de la 2^e harmonique par rapport à la 1^e était inversement proportionnel à la taille des populations de champs récepteurs. Le modèle a également été adapté à une activité neuronale en réponse à un stimulus dont la direction changeait périodiquement. Du fait de la sélectivité à la direction et à l'orientation, la réponse neuronale pouvait être modélisée par un profil bimodal avec une réponse pour la direction préférée et une autre, pour la direction anti-préférée. Dans ce cas, la réponse à la 2^e harmonique était liée à l'orientation et la 1^e harmonique possédait des informations quant à la direction. De plus, le ratio de la 1^e harmonique sur la 2^e pourrait être utilisé comme un indice de sélectivité à la direction. Ces deux descriptions théoriques de réponse unimodale et bimodale ont par la suite été validées sur le cortex visuel du chat.

Mesures expérimentales de la réponse hémodynamique et de la taille des populations de champs récepteurs

Les réponses périodiques de multiple barres présentées simultanément dans le champ visuel (maximum = 4) ont pu être isolées du bruit grâce à la transformée de Fourier et ont permis d'évaluer le profil spectral de la réponse hémodynamique. Cette dernière était homogène sur l'ensemble du cortex permettant ainsi une estimation *relative* de la taille des populations de champs récepteurs à partir du ratio de la 2^e sur la 1^e harmonique. Comparé à l'aire 18, ce ratio était plus fort que dans l'aire 17 où les champs récepteurs sont connus pour être plus petits. De plus, une relation positive entre le ratio et la fréquence spatiale optimale (considérée comme inversement proportionnelle à la taille des champs récepteurs), a été observé confirmant ainsi le lien entre le ratio et la taille des populations de champs récepteurs. Néanmoins, il semble que la contribution du bruit n'a pas pu être adéquatement intégrée dans notre modèle inverse. Ainsi, à ce stade, l'évaluation *absolue* de la taille des champs récepteurs reste impossible.

Mesures expérimentales de la sélectivité à la direction

L'homogénéité de la réponse hémodynamique a également permis d'évaluer la sélectivité *relative* à la direction à l'aide de stimuli en mouvement dont la direction changeait de manière périodique. L'emploi de réseaux de barres a permis de révéler des cartes d'orientation à la 2^e harmonique en seulement quelques minutes dans l'aire 18. En utilisant ces réseaux de barres ou des points aléatoires en mouvement, il a également été possible de révéler des cartes de direction à la 1^e harmonique. Ces cartes de 1^e harmonique étaient complètement abolies lorsque le mouvement n'était plus évoqué (réseaux statiques). Le ratio de la 1^e sur la 2^e harmonique a été calculé pour révéler un indice de sélectivité à la direction. Ce ratio était plus faible au niveau des fractures séparant les modules de directions opposées, où les neurones sont connus pour avoir une sélectivité à la direction plus faible. Par rapport à l'aire 18, ce ratio semblait également plus faible dans les aires corticales impliquées dans la voie ventrale (i.e. aires 17 et 21a), moins engagées dans l'analyse du mouvement.

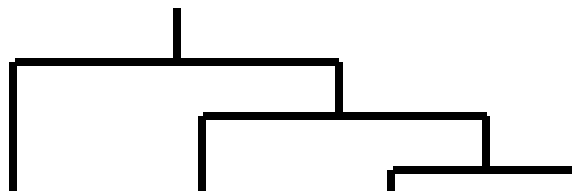
En conclusion ce modèle a permis de démontrer l'élargissement des possibilités offertes par le paradigme de stimulation continue dont l'intérêt majeur reste l'augmentation importante du rapport signal / bruit.

6. Considérations techniques

6.1 Choix du modèle et de la préparation

L'ensemble des études de cette thèse a été réalisé dans le cortex visuel du chat anesthésié. Ce modèle est particulièrement utilisé en vision en raison de l'organisation complexe de ses structures visuelles. Toutefois, l'extrapolation des résultats observés chez le chat pour comprendre le fonctionnement du système visuel des mammifères en général et des primates en particulier implique une certaine attention. En effet, la distance génétique entre les carnivores et les primates est importante, beaucoup plus que celle entre les rongeurs et les primates (figure 23). Néanmoins, beaucoup plus de similitudes anatomo-fonctionnelles sont observées entre les carnivores et les primates par rapport à une comparaison entre rongeurs et les primates (e.g. présence de carte d'orientation). Ces similitudes pourraient être le fruit d'un ancêtre commun possédant un patron d'organisation corticale commun, avant la scission entre l'évolution indépendante des carnivores, des primates et des rongeurs. Une autre hypothèse serait une convergence fonctionnelle induite par des facteurs extrinsèques. Cette théorie est d'ailleurs supportée par l'extrême diversité d'architectures anatomiques observée entre mammifères produisant malgré tout des organisations fonctionnelles comparables (Van Hooser, 2007).

L'utilisation de modèles anesthésiés peut également avoir affectée les observations. Plusieurs études ont par exemple constaté une variation dans le couplage hémodynamique entre les animaux éveillés et anesthésiés (Martin et al., 2006, Berwick et al., 2002). L'anesthésie à l'halothane dans les études de cette thèse a pu également affecter la réponse des neurones du cortex visuel primaire et des aires de plus haut niveau ainsi que leurs rétrocontrôles. Ainsi, la faible amplitude des cartes d'orientation et l'absence de carte de direction dans l'aire 21a observées dans l'étude 2, ont pu en partie être liées à l'utilisation d'un modèle anesthésié. Il est à noter qu'une récente étude réalisée dans le laboratoire a montré que l'utilisation de l'halo-



		Carnivores	Rongeurs et Lagomorphes	Scadentia (tupayes)	Primates
Vision		Frontale	Latérale	Latérale	Frontale
V1	Surface (mm ²)	Chat : 380	Rat : 7		Macaque : 1325
	Orientation	Modules	Pas de module (1)	Modules	Modules
	Direction	(modules)		(pas de module, 1)	(pas de module)
	Dom. oculaire	Modules	Pas de module	Pas de module	Modules
	Fréq. spatiale	Modules		(modules, 1)	Modules
	Centre/Pourtour	Modules (2)			(pas de module)
V2 (3)	Orientation	Modules		(pas de module, 1)	Modules
	Direction	Modules		(1)	
Aires de haut niveau de la voie ventrale	e.g.	21a			V4
	Orientation	Modules (2)			Modules
	Direction	Pas de module (2)			
	Fréq. spatiale	Pas de module (2)			
Aires de haut niveau de la voie dorsale	e.g.	PMLS		TD	MT
	Orientation			(1)	Modules
	Direction			(1)	Modules
	Centre/Pourtour				Modules

Figure 23. Cartes corticales et phylogénie

Organisations modulaires révélées dans le cortex visuel de certains mammifères. En haut se trouve l'arbre de filiation phylogénique. Les cases sont blanches lorsque les données sont insuffisantes. Les données sont entre parenthèses lorsqu'une certaine controverse existe. Légende : (1) Sera l'objet des études présentées dans les annexes de cette thèse. (2) Organisation mises en évidence dans les études de cette thèse. (3) Dans ce tableau, la terminologie V2 a été attribuée à l'aire 18 des carnivores à des fins de simplification. Adaptée de Von Hooser (2007) et des informations présentes dans l'introduction de cette thèse.

thane était moins critique que certains autres agents anesthésiant (Villeneuve et Casanova, 2003).

6.2 La mesure du signal en imagerie optique

6.2.1 De quel compartiment fonctionnel provient le signal ?

Lors d'une activation neuronale, les changements de potentiel de membrane sont à l'origine d'une modification des gradients ioniques transmembranaires qui vont par la suite être rétablis en utilisant l'énergie cellulaire apportée par l'ATP provenant essentiellement de mécanismes aérobiques. L'activation neuronale est ainsi à l'origine d'une consommation accrue d'O₂ et va provoquer une augmentation du flux sanguin. Ces mécanismes de modification de l'oxygénation du sang induit par l'activation neuronale sont mesurés aussi bien en imagerie optique qu'en IRMf.

Ces variations de gradients ioniques sont générées aussi bien au niveau des dendrites dans la partie post-synaptique de la synapse que dans les axones où se trouvent les potentiels d'action. Pour un niveau de décharge moyen, les signaux hémodynamiques mesurés proviennent donc d'une combinaison des activités supra- et infralimaires (Attwell et Laughlin, 2001). Par contre, lorsque l'activation des neurones devient plus importante (e.g. dans les domaines d'orientation activés optimalement à 100% de contraste), la part de la contribution de l'activité supraliminaire peut devenir majoritaire.

En se basant sur le fait que la majorité des neurones du cortex sont glutamatergiques, l'essentiel de l'activité métabolique d'origine infraliminaire devrait être de nature excitatrice. Toutefois, étant donné que le niveau de décharge des interneurons inhibiteurs est plus haut, ceux-ci pourraient contribuer de manière significative aux signaux intrinsèques. Ainsi dans le cas de l'étude 1, l'augmentation de l'activité inhibitrice pré- et post-synaptique dans le centre de l'activation et originaire de la stimulation du pourtour devrait provoquer une augmentation du signal s'opposant à la réduction de l'activité supraliminaire. Dans le principe cette contribution pourrait donc effacer la possibilité de mesurer une modulation spatiale de la suppression en utilisant des méthodes basées sur la mesure du métabolisme local (e.g. signaux intrinsèques, 2-DG, BOLD, ...).

Malgré cela, les études de marquage au 2-DG par Born (2000) ont prouvé que cette contribution inhibitrice ne semblait pas affecter les modulations spatiales de l'activité métabolique supraliminaire provoqué par les phénomènes de suppression centre vs. pourtour. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une partie de l'activité inhibitrice locale provient en effet du pourtour mais également du centre de la stimulation venant ainsi contrebalancer cet effet. Ces résultats pourraient aussi être interprété par le fait que l'activité supraliminaire de sortie des neurones du centre vont être suivit d'une activation d'un réseau local spécifique lui aussi couplé à une augmentation du métabolisme local.

La présence de l'activité présynaptique et postsynaptique infraliminaire dans le signal est à l'origine du fait que l'étendue de l'activation mesurée en imagerie optique est plus large que celle générée par les potentiels d'action. Ce phénomène participe à l'étalement de la réponse observé par (Das et Gilbert, 1995) et a été exploité dans l'étude 1 (voir figure 7 de l'introduction). Ceux-ci ont constaté qu'une activation provoquée par un petit stimulus dans le champ visuel produisait une activation de 4 mm dans le cortex alors que l'étendue où l'on pouvait observer une augmentation des potentiels d'action n'était que de 1 mm. La réciproque de ce phénomène est que l'activité de chaque pixel en imagerie optique correspond à une surface du champ visuel plus large que celle « vue » par la population de champs récepteurs.

Ainsi la taille des populations de champs récepteurs mesurée en imagerie optique (et l'étendue spatiale de la réponse) dépendent de nombreux facteurs dont (1) la taille moyenne des champs récepteurs, (2) et leur taux de dispersion, (3) la résolution spatiale de la méthode (de l'ordre de 0.1 mm pour l'imagerie optique, (Polimeni et al., 2005), (4) la résolution spatiale du filtre hémodynamique (essentiellement les capillaires dans le cas des cartes modulaires) et (5) de la contribution de l'activité infraliminaire et présynaptique dans le signal.

Dans l'étude 1 et 3a, tout comme dans l'étude de (Dumoulin et Wandell, 2008), les tailles de champs récepteurs évaluées correspondaient à cette somme de facteur. Le retrait du filtre hémodynamique (4) et de la contribution de l'activité infraliminaire et présynaptique (5) aurait pu permettre une estimation plus réaliste de la taille des populations de champs récepteurs. De plus, dans l'étude 1, l'organisation en carte de

suppression pourrait être présente uniquement au niveau du signal infraliminaire ou du compartiment présynaptique. Ce dernier aspect est similaire à celui rencontré dans le cortex visuel primaire du chat où la direction globale des *plaids* est organisée en domaine de direction au niveau de la population des réponses mais pas au niveau de l'activité supraliminaire des neurones individuellement (Schmidt et al., 2006).

L'accès à l'activité supraliminaire seule représenterait donc un intérêt pour mieux comprendre si l'organisation modulaire observée pour la suppression pourrait provenir d'une organisation spatiale des rétrocontrôles. Si c'est le cas, on pourrait également s'attendre à observer des latences plus longues que pour des organisations provenant principalement de projections directes du CGL telles que les cartes d'orientation. Toutefois, l'imagerie des signaux intrinsèques ne possède pas une résolution temporelle suffisante pour étudier cette question.

L'emploi de méthodes d'imagerie optique non hémodynamiques, ayant une meilleure résolution temporelle et mesurant l'activité supraliminaire pourraient donc s'avérer profitables. Les changements fonctionnels produits lors d'une activation neuronale sont multiples et permettent ainsi d'accéder à l'activation neuronale de multiples façons. Le chapitre suivant va donc présenter d'autres alternatives à l'imagerie optique des signaux.

6.2.2 Quelles sont les alternatives à l'imagerie des signaux intrinsèques ?

Dispersion rapide de la lumière :

Les photons dans le cerveau sont déviés à chacune des interfaces cellulaires et interstitielles en raison des changements d'indice de réfraction des différents milieux. Lors d'une stimulation, des mouvements de ces interfaces et des changements d'indices de réfraction vont se produire en raison des flux d'eau et d'ion aux travers des membranes.

Ces mouvements sont à l'origine d'une variation de la dispersion de la lumière, particulièrement visible en infrarouge, et ont pu être exploités *in vitro* et *in vivo* (Hill et Keynes, 1949, MacVicar et Hochman, 1991, Rector et al., 2005). Plus récemment, ce principe a même été exporté avec succès à la microscopie de cohérence optique en

3 dimensions (OCT), dont le principe se base sur la détection des changements de milieu (Aguirre et al., 2006, Chen et al., 2009, Maheswari et al., 2003).

L'avantage de ce signal est son couplage direct avec l'activité électrique du neurone qui en fait une mesure à haute résolution temporelle et très spécifique. Néanmoins, étant donné qu'une grande partie de l'activité électrique, générée par ces mouvements d'ions, provient des dendrites, la nature de ce signal est à la fois infra- et supraliminaire.

Autofluorescence des transporteurs d'électrons :

L'activité métabolique du neurone peut également être mesurée en enregistrement l'état d'oxydation des transporteurs d'électron de la chaîne mitochondriale dans les cellules du cerveau. En effet, l'augmentation de production d'ATP nécessaire au rétablissement des gradients ioniques modifiés par l'activation neuronale, se fait par le biais de l'oxydation complète du glucose (ou du lactate) en CO_2 . Les électrons produits lors de cette oxydation sont alors transférés à la mitochondrie où leur énergie permet de créer un gradient d'acide tout en réduisant l' O_2 en H_2O . Ce gradient d'acide est par la suite utilisé pour le fonctionnement d'un générateur d'ATP.

Le transfert des électrons vers, et dans la mitochondrie se fait par le biais de transporteurs d'électrons tels que les flavoprotéines (e.g. FAD et FMN). Ces molécules ont la propriété d'avoir un niveau de fluorescence variable en fonction de leur état d'oxydation. L'exploitation de ce signal présente donc également l'avantage d'un couplage direct avec l'activation neuronale (Shibuki et al., 2003, Tohmi et al., 2006). Par contre, tout comme le signal présenté précédemment, celui ci est également de nature infra- et supraliminaire.

En illuminant le cerveau entre 420 et 490 nm et en mesurant la fluorescence intrinsèque produit à 510 nm et plus, (Husson et al., 2007) ont montré le potentiel de cette méthode en révélant des cartes de rétinitopie et d'orientation similaires entre l'autofluorescence et l'imagerie des signaux intrinsèques provenant de l'hémoglobine (figure 24). Pourtant, en reproduisant ces expériences exactement dans les mêmes conditions nous n'avons pu mesurer des variations de signal de l'autofluorescence fiables. En effet, contrairement à une augmentation de fluorescence rapide, nou

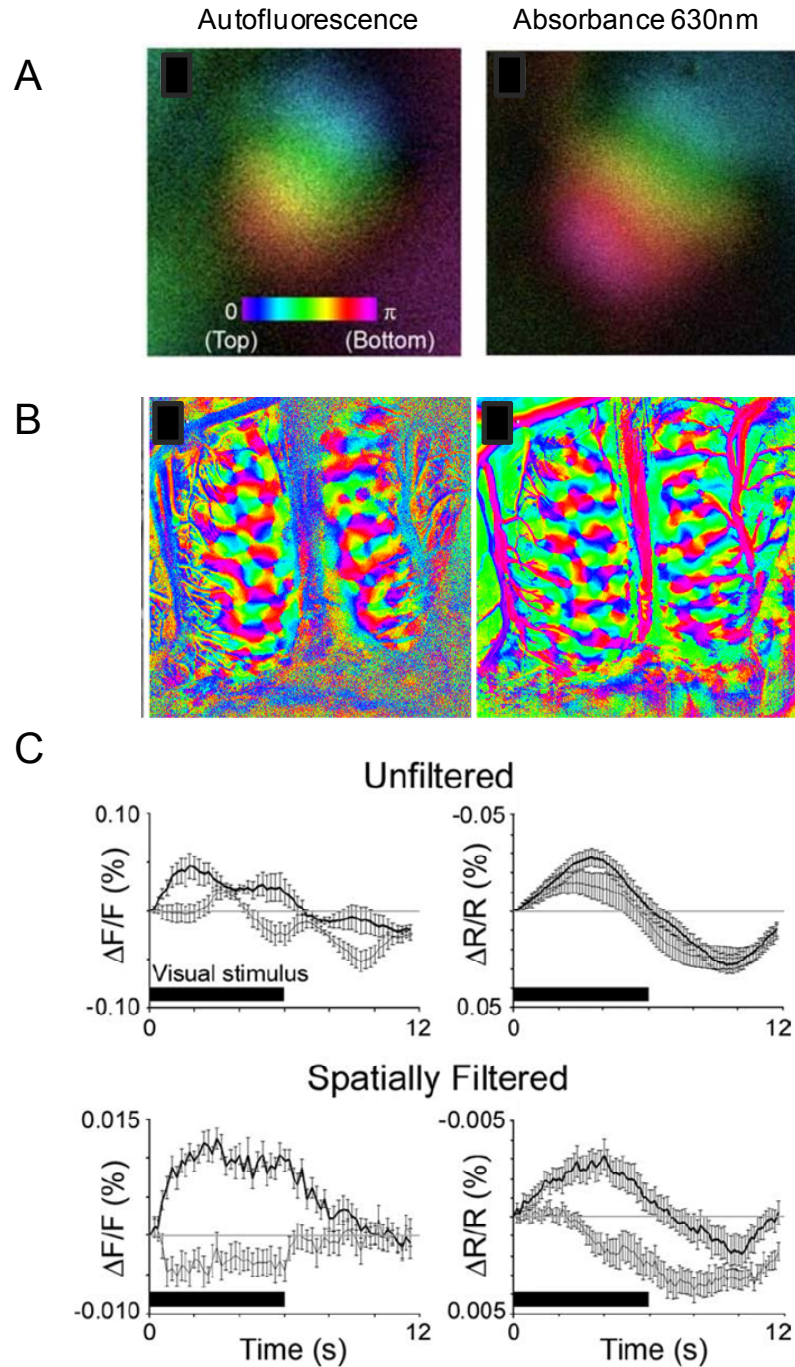


Figure 24. Autofluorescence des flavoprotéines.

(A-B) Cartes de rétinotopie chez la souris (A) et d'orientation chez le chat (B) mesurées à partir de l'autofluorescence (à gauche) et de l'absorbance à de l'hémoglobine (à droite). (C) Réponses visuelles dans un domaine sélectif aux orientations horizontales pour des stimulations horizontales (ligne épaisse) ou verticales (ligne fine) avant (haut) et après (bas) un filtrage spatial à partie du signal de l'autofluorescence (à gauche) et de l'absorbance de l'hémoglobine (à droite). Adaptée de Husson et al., (2007).

avons observé une diminution lente de la fluorescence probablement attribuable aux variations de volume sanguin absorbant la lumière d'excitation et d'émission (dans la gamme vert-bleue du spectre, voir figure 34 de l'annexe).

Colorants sensibles au voltage :

Toutes les méthodes présentées précédemment employaient des marqueurs intrinsèques. L'emploi de marqueurs extrinsèques (ou intrinsèques mais génériquement codés) est aussi possible telles que les sondes sensibles au voltage. Ces molécules ont la propriété de s'intégrer dans les membranes des neurones et d'avoir une fluorescence variable en fonction du potentiel transmembranaire (Shoham et al., 1999). Ainsi, en employant un dispositif similaire à celui de l'autofluorescence il est possible de mesurer directement l'activité électrique des neurones avec une très forte résolution temporelle. Toutefois, tout comme l'autofluorescence, le signal électrique mesuré provient encore une fois de l'activité infra- et supraliminaire. De plus, le signal est généralement de faible contraste et extrêmement sensible au signal intrinsèque et au bruit vasculaire (Hillman, 2007). C'est une des raisons à l'origine de l'utilisation de sondes opérants dans des gammes de longueur d'onde moins affectées par l'absorption de l'hémoglobine (i.e. rouge) ce que ne permet pas l'autofluorescence présentée préalablement.

Colorants sensibles au calcium :

L'emploi de sondes sensibles au calcium intracellulaire est d'un grand intérêt. Non seulement ces marqueurs génèrent un signal plus fort (Hillman, 2007) mais surtout, l'augmentation de l'entrée de calcium se produit lors des potentiels d'action (Smetters et al., 1999). Ainsi, l'exploitation de ces signaux, permettrait de mesurer l'activité supraliminaire indépendamment de l'activité infraliminaire et ce, avec une forte résolution temporelle. *In vivo*, ces méthodes ont tout d'abord été employée en conjonction avec la microscopie par deux photons (Stosiek et al., 2003, Ohki et al., 2006, Ohki et al., 2005), puis, macroscopiquement en employant un dispositif de fluorescence similaire à celui utilisé pour les sondes sensibles au voltage ou l'autofluorescence ((Bouchard et al., 2009), figure 25). Dans le futur, l'emploi de

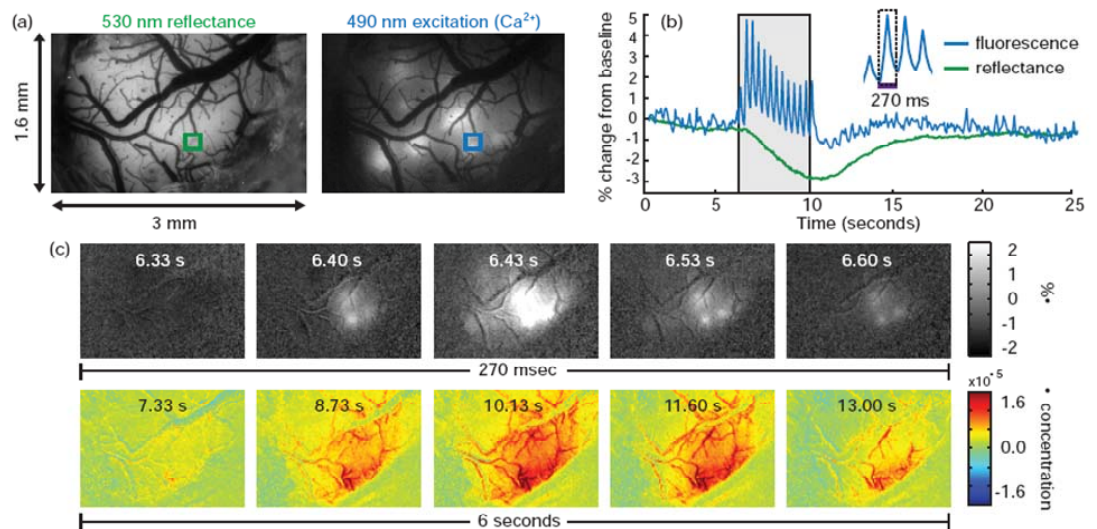


Figure 25. Colorants sensibles au calcium

(a) absorbance à 530 nm (droite) et fluorescence des sondes sensibles au calcium (gauche) dans le cortex somatosensoriel du rat. (b) Signal de l'absorbance (vert) et de la fluorescence au calcium (bleue) en réponse à des stimulations répétées. Notez la dynamique temporelle du signal des sondes sensibles au calcium beaucoup plus rapide et de forte amplitude. (c) Vidéoséquence de la réponse au calcium (en haut, durée de la séquence = 0.27s) et de l'absorbance (en bas, durée = ~6s). Adaptée de Bouchard et al., (2009).

sondes sensibles au calcium permettrait donc d'étudier plus spécifiquement l'origine des cartes de suppression observée dans l'étude 1.

En conclusion, l'imagerie des signaux intrinsèques offre une facilité d'emploi et une résolution spatiale suffisante pour étudier l'organisation modulaire du cerveau. Malgré cela, sa résolution temporelle reste limitée et l'emploi de colorants sensibles au calcium (ou au potentiel de membrane pour plus de pénétration) peuvent être nécessaire lorsque la dynamique de l'activation est recherchée. Malgré tout, la contribution présynaptique dans le signal restera toujours présente avec toutes ces techniques d'imagerie macroscopique. Ainsi, l'électrophysiologie unitaire ou plus récemment la microscopie par deux photons du calcium restent les deux principales méthodes permettant de mesurer l'activité infraliminaire postsynaptique et ce, individuellement pour chaque neurone.

6.2.3 De quelles couches corticales proviennent les signaux ?

L'absorption des photons dans le cerveau est variable en fonction de leur longueur d'onde. Dans la partie bleu-verte du spectre visible, l'absorption est importante en raison de l'hémoglobine ce qui limite la profondeur des enregistrements effectués (voir la figure 14 de l'introduction). Par contre, dans la partie rouge-infrarouge du spectre, l'absorption de l'hémoglobine est plus faible ce qui augmente la pénétration des enregistrements (Frostig et al., 1990).

Ainsi, l'autofluorescence des flavoprotéines et les sondes sensibles au calcium, utilisant la partie bleu-verte du spectre, voient leurs enregistrements limités aux couches superficielles du cortex. Par contre, l'imagerie des signaux intrinsèques s'effectue généralement entre 600 et 700 nm. L'origine du signal provient donc des couches supérieures mais également, dans une moindre mesure, de la couche IV. La mesure de la « dispersion rapide de la lumière » et de la fluorescence des sondes sensibles au voltage présentées précédemment, utilisant cette même gamme de longueurs d'onde accèdent à priori à ces mêmes couches corticales.

L'accès limité de l'imagerie optique à la couche IV et inexistant pour les couches inférieures pourrait avoir été à l'origine de l'absence de carte de direction observée dans l'aire 21a (étude 2). En effet, la présence d'une organisation modulaire pour la direction dans les couches inférieures ne peut pour l'instant pas être exclue. Ainsi, l'utilisation de méthodes plus pénétrantes et permettant une discrimination laminaire pourront offrir des avancées majeures pour l'étude de l'organisation anatomo-fonctionnelle du cortex (Hillman et al., 2007, Belanger et al., 2010).

6.2.4 Pourquoi y a-t-il une réponse neuro-hémodynamique ?

A la suite d'une stimulation, se produit une diminution de la concentration en Hb et une augmentation de la concentration en HbO₂ (Hillman et al., 2007, Dunn et al., 2005). La figure 26 montre que l'étendu de ces variations d'oxygénation est en générale beaucoup plus large que celle de l'activation neuronale (Thompson et al., 2005, 2004, 2003, Malonek et Grinvald, 1996). De plus, des études réalisées en tomographie par émission de positrons, confirmées depuis avec l'imagerie optique, ont montré que les changements d'apport en O₂ étaient 10x plus fort que les changements de la consommation en glucose (Fox et Raichle, 1986, Fox et al., 1988). La raison pour laquelle la quantité d'oxygène fournie est démesurément plus grande que celle nécessaire lors d'une activation neuronale reste un mystère. Tout se passe en effet comme si « un jardin tout entier était arrosé pour les besoins d'une seule fleur » (Vanzetta et Grinvald, 2008). (Malonek et Grinvald, 1996) ont tout d'abord proposé comme hypothèse qu'il s'agirait d'un phénomène de protection anti-anoxie. Une autre hypothèse serait que le transfert de l'oxygène au tissu dépendrait du flux sanguin basal. En effet, dans les capillaires proches des artérioles, l'oxygénation est forte et l'écoulement est rapide. Une augmentation modérée du flux sanguin ne serait donc pas suffisante pour augmenter le transfert d'O₂ par rapport aux capillaires dans lesquels le débit basal est plus lent (voir pour revue : (Vanzetta et Grinvald, 2008)). Deux autres hypothèses ne sont pas toujours abordées. La première étant que cette « disproportion » hémodynamique observée en laboratoire n'est peut être pas présente dans le cas de stimuli naturels. En effet, la situation dans laquelle un grand nombre de neurones sont stimulés optimalement pendant plusieurs secondes apparaît beaucoup

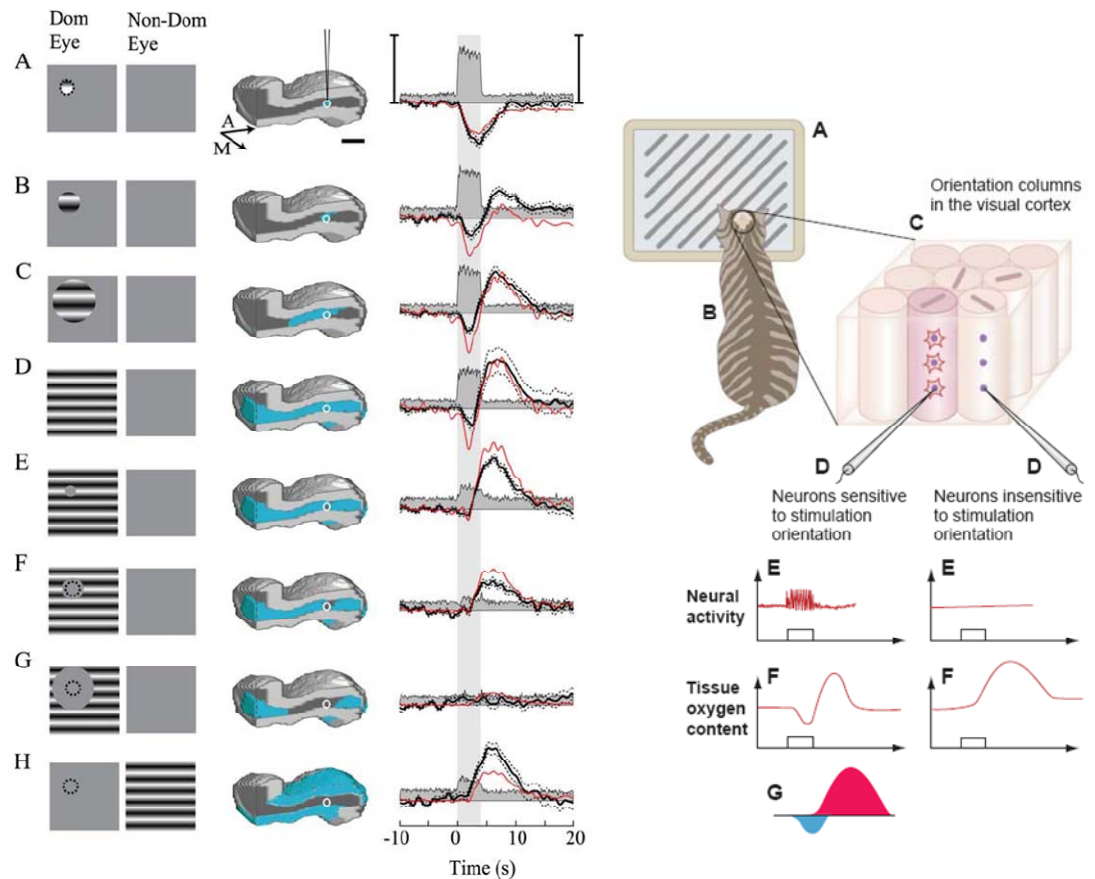


Figure 26. Variations spécifiques et non-spécifiques de l'oxygénation

(à gauche) Mesures des changements d'oxygénation du tissu (courbe noire à droite) et de l'activation neuronale (en gris à droite) dans la couche A1 du CGL du chat en fonction de la stimulation visuelle (à gauche). (à droite) Schéma des variations d'oxygénation (F) et d'activation neuronale (E) dans (et à l'extérieur) des colonnes d'orientation activées (C). Cette figure montre que la diminution locale de l'oxygénation est spécifique de la stimulation (déflexion bleue en G) alors que l'augmentation de l'oxygénation (rouge) est non spécifique spatialement. Adaptée de Thompson et al. (2005) et Mayhew (2003).

moins souvent dans un environnement naturel que lors d'une expérience lorsque sont présentés par exemple des réseaux de barre à la fréquence spatiale et à l'orientation optimale à 100% de contraste.

Une autre hypothèse, pourrait être qu'une part de la réponse hémodynamique provienne d'une synchronisation des fluctuations cérébrales. En effet, lorsque le temps d'enregistrement était suffisamment long, plusieurs expériences réalisées chez le chat ($n = 3$) ont montré des oscillations de ~ 0.1 Hz durant parfois jusqu'à 40 s après la stimulation (voir figure 35 de l'annexe). Le profil de ces oscillations allait donc bien au delà d'une simple 3^e phase négative observée chez le rat par (Chen-Bee et al., 2007).

L'analyse de chaque répétition indépendamment a ensuite révélé que les *phases* des ondes de Mayer présentent avant la stimulation semblaient se synchroniser avec la présentation du stimulus ($n = 1$). Ces résultats suggèrent donc qu'il pourrait exister une relation très intime entre la notion de « réponse hémodynamique » et « ondes de Mayer ». Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par le fait que la réponse impulsionnelle de la réponse hémodynamique (mesurée dans l'étude 3a) se situe exactement dans la même gamme de fréquence que les ondes de Mayer ($\sim 0.1 - 0.15$ Hz).

6.3 Le gain apporté par la nouvelle avenue de la stimulation continue

L'origine du signal n'est pas la seule considération technique à prendre en compte en imagerie optique. En effet la prédominance du bruit vasculaire est également une problématique ayant fait l'objet de nombreuses études (voir chapitre 3.4.2 de l'introduction). Dans les études 3a et 3b, l'extraction du signal visuel périodique indépendamment du bruit périodique s'est révélée être une approche particulièrement payante dans la mesure où le gain de rapport signal / bruit est considérablement augmenté (Kalatsky et Stryker, 2003, Engel et al., 1994, Boynton et al., 1996). Toutefois, cette nouvelle approche, basée sur la discrimination des signaux via la transformée de Fourier, ne peut extraire la totalité des sources de bruit.

6.3.1 La stimulation continue ne peut pas extraire tout le bruit

Dans certains cas en effet, les sources de bruit peuvent être non périodiques, et de ce fait mal prise en compte par les approches utilisant une analyse fréquentielle. Le « bruit rose » ($1/f$) généré par l'électronique de l'acquisition ne représente pas une source de bruit majeure aux fréquences utilisées. Par contre, certaines fluctuations dans l'illumination du cortex, causées le plus souvent pas une mauvaise régulation du courant, peuvent être la cause de larges fluctuations aléatoires dans le signal. Lorsqu'elles apparaissent, ces fluctuations peuvent être de l'ordre de 100 à 1000 fois plus forte que le signal physiologique et leur contribution peut être visible dans toute la gamme de fréquence utilisée empêchant ainsi la mise en évidence des cartes.

Une solution s'est avérée particulièrement efficace pour supprimer cette source de bruit en soustrayant en chaque pixel le profil de ces fluctuations, estimées à partir d'une zone de référence de l'image sans activité physiologique (e.g. le crâne). Cette méthode est détaillée dans l'annexe 8.5 et a été utilisée dans les études 3a et 3b ainsi que les annexes 8.2, 8.3 et 8.4 de cette thèse. Il est à noter que cette méthode diffère de la soustraction de la ligne de base effectuée dans l'étude de (Kalatsky et Stryker, 2003) qui ont éliminé les variations lentes du signal pour chaque pixel, en effectuant un filtrage temporel. Ainsi, leur stratégie n'a permis de réduire que les contributions dans les basses fréquences et la composante DC, qui le plus souvent n'affectent pas le signal se trouvant à des fréquences plus hautes. Son utilisation n'apporte donc aucun gain et n'a pas été utilisée dans cette thèse (résultats non montrés).

Dans certains cas, les composantes associées à la stimulation visuelle peuvent coïncider avec des portions du spectre où les composantes de bruit physiologique périodique sont importantes : dans les basses fréquences et au niveau du bruit vasomoteur. Dans la plupart des cas, ces composantes sont indentifiables mais parfois, certaines composantes peuvent avoir été « reployées » par l'aliasing de l'échantillonnage (résultats non montré). C'est en particulier le cas des harmoniques provenant des battements cardiaques dont la fréquence fondamentale peut varier de 2 à 4 Hz pour le chat et jusqu'à 8 Hz pour la souris. Lorsque la fréquence d'échantillonnage est insuffisante, les pics positionnés au delà de la fréquence de Nyquist (fréquence d'échantillonnage / 2) peuvent se reposer en miroir à des fréquences plus basses. Par exemple, les enregistrements effectués dans les études

présentées dans cette thèse ont rarement dépassé des fréquences d'échantillonnage de 8 Hz. Ainsi, si par exemple la première harmonique des battements cardiaques était à 3.9 Hz, le pic correspondant à la 2^e harmonique, verrait alors sa fréquence reemployée à 0.2 Hz ($8 \text{ Hz} - 2 \times 3.9 \text{ Hz}$) ce qui pourrait coïncider avec des composantes visuelles.

Il convient donc de choisir les fréquences de stimulation de manière à ce qu'elles ne coïncident pas avec ces sources de bruit physiologique. Toutefois, dans la majorité des cas, le profil spectral de ces sources de bruit était continu et sur une gamme de fréquences large. C'était par exemple le cas des ondes de Mayer dont la moyenne des oscillations se situe autour de 0.1Hz ((Mayhew et al., 1996), ~0.14 Hz dans nos études) et dont la gamme de fréquence peut s'étaler sur ~0.05 Hz du fait des variations dans le rythme de ces pulsations. Il est ainsi parfois difficile d'éviter ces sources de bruit, dans la mesure où la fréquence optimale de la réponse hémodynamique (et donc du signal optique), se situe aux mêmes fréquences que les ondes de Mayer (comme cela est démontré dans l'étude 3a).

Du fait de la nature additive de la transformée de Fourier, la soustraction de ces composantes de bruit est malgré tout possible dans le domaine spectral. La façon la plus logique serait de réaliser la soustraction d'une réponse spectrale obtenue dans les conditions d'une stimulation par une autre de référence, obtenue sans stimulation. Néanmoins, cette stratégie impose de doubler les temps d'enregistrement et suppose que la nature du bruit ne va pas varier entre les deux sessions. Une autre alternative, utilisée dans les études de cette thèse, consistait à soustraire la ligne de base du bruit moyen en l'estimant à l'aide d'un lissage dans le domaine spectral (e.g. lignes rouges dans la figure 2B de l'article 3b). Cette méthode a permis ainsi une estimation plus exacte de l'*amplitude* du signal mais reste inutilisable pour corriger l'influence du bruit sur la *phase*.

Aux fréquences utilisées en stimulation continue, les composantes de bruit proviennent principalement des ondes de Mayer qui se manifestent par des fluctuations de basse fréquence spatiale (i.e. ondes de plusieurs millimètres se propageant lentement sur le cortex).

Etant donné leur profil spatial, leur élimination par un filtrage spatial passe-bande s'est avérée très efficace dans l'étude 3b et dans d'autres utilisant la stimulation

continue pour révéler les modules d'orientation (Fukuda et al., 2006, Jha et al., 2005). Toutefois, comme mentionné en introduction, le filtrage spatial est inefficace dans le cas des cartes de rétinotopie et suppose un « à priori » sur la structure spatiale des cartes modulaires. Des détails sur le filtrage spatial utilisé sont présentés dans les figures 36 et 37 de l'annexe.

6.3.2 Normalisation

La discrimination des composantes par la décomposition spectrale offre également l'avantage que l'activité basale présente dans le signal en stimulation épisodique se retrouve dans la composante DC et les basses fréquences en stimulation continue. Il n'est donc, en théorie, plus nécessaire de normaliser le signal par rapport à une condition de référence (Kalatsky, 2009). Néanmoins, le chapitre précédent a montré qu'une partie du bruit pouvait être présent au niveau des harmoniques de la stimulation. Des soustractions restent donc parfois nécessaires avant de pouvoir exploiter les harmoniques directement. De plus, l'exploitation directe de l'amplitude du signal étant dépendante du niveau d'illumination, une normalisation par une image de référence, reste néanmoins nécessaire lors de comparaisons d'amplitude de signal.

En conclusion, la *stimulation continue* représente une méthode simple et particulièrement efficace pour augmenter le rapport signal / bruit. Mais il s'avère que l'exploitation des composantes spectrales directement est insuffisante. Le plus souvent, la transformée de Fourier devra-t-être précédée par (1) une correction des fluctuations d'illumination et (2) d'un filtrage spatial des enregistrements (dans les cas des cartes d'orientation et de direction) et être suivie par (3) une soustraction du profil spectral du bruit et (4) d'une division par une image de référence.

6.3.3 Résolution spatiale et polaire

Un autre aspect bénéfique de la stimulation continue est son gain en termes de résolution. Cet aspect est particulièrement vrai dans le cas de la rétinotopie puisqu'une infinité de positions sont évoquées (comparez la figure 3 de l'article 3a avec la figure 38 de l'annexe). Malgré cela, dans le cas de l'orientation et de la

direction, cet argument est un peu plus discutable dans la mesure où le calcul de l'orientation préférée est effectué à une harmonique (déphasage d'une sinusoïde). Cela rend la méthode, dans le principe, similaire à la « somme des vecteurs » à la différence qu'une infinité d'orientations sont utilisées. Toutefois, (Womelsdorf et al., 2001) ont montré qu'au delà de 8 orientations présentées, le gain de résolution polaire n'était pas majeur. Outre le gain en terme de rapport signal / bruit, il est en effet très difficile de constater le moindre gain de résolution dans la carte d'orientation à l'aide de la stimulation continue dans l'article 3b ou dans l'article de Kalatsky et Stryker (2003). La comparaison entre les mesures d'orientation montre en effet une similarité entre la stimulation épisodique et continue (figure 3, panneau C1 et figure 4, panneaux B et E de l'article 3b).

Que le gain de résolution polaire soit dû au mode de stimulation ou au nombre plus important d'orientations présentées (grâce au temps d'enregistrement plus réduit), la stimulation continue apporte un intérêt majeur par rapport au mode de stimulation épisodique. En effet, dans l'étude 1 et 2, la fréquence spatiale (et dans certains cas le « diamètre optimal ») a été évaluée à partir de cartes d'orientation différentielles provenant des deux orientations cardinales et ce, pour plusieurs fréquences spatiales. Ce nombre réduit d'orientations a été choisi pour permettre de tester un maximum de fréquences spatiales dans un temps « raisonnable » (dans le cas de la figure 5 de l'article 2, le temps d'expérience était d'environ 7h !).

Le problème est que dans cette configuration, les modules d'orientations obliques ne sont pas stimulés optimalement et une partie des pixels, entre les domaines d'orientations cardinales vont donc ne pas être activés. Ainsi, les mesures de fréquences spatiales dans, et à proximité de ces domaines non activés risquent d'être erronées ce qui peut empêcher une quantification adéquate de la structure spatiale des cartes.

En conclusion, la réalisation de cartes de fréquence spatiale à partir de cartes d'orientation réalisées en stimulation continue peut donc représenter un gain non négligeable en terme de résolution et de recouvrement spatiale (voir figure 42 de l'annexe)

6.3.4 Estimation de la réponse hémodynamique et de la taille des champs récepteurs.

Quelque soit le profil temporel de la réponse neuronale, les valeurs des premières harmoniques pour chaque fréquence peuvent être utilisées pour reconstituer la réponse impulsionnelle hémodynamique. Afin d'obtenir une résolution spectrale suffisante, les mesures doivent être effectuées à plusieurs fréquences ce qui peut allonger le temps d'expérience. Néanmoins, la linéarité de la Transformée de Fourier a permis de combiner les tests au sein d'une même session d'enregistrement (étude 3a et (Kalatsky et al., 2006)). Cela a en plus minimisé l'impact des fluctuations physiologiques entre les sessions d'enregistrement.

Le principal intérêt de reconstruire le profil de la réponse hémodynamique est de pouvoir la prendre en compte dans les modèles exposés dans les études 3a et 3b. Certes, cette estimation aurait pu se faire de manière épisodique, en obtenant la réponse temporelle pour une stimulation courte (e.g. un damier ou un réseau de barres). Malgré tout, l'approche présentée ici, possède l'avantage d'estimer la réponse en employant exactement le même stimulus que dans les conditions de mesure de la taille des champs récepteurs (i.e. des barres en mouvement). Malgré cela, l'incorporation de la réponse hémodynamique, mesurée aussi bien en stimulation périodique, qu'épisodique, n'a pas permis d'obtenir les valeurs absolues de population de champs récepteurs attendues.

Dans l'étude 3a, la réponse à une barre en mouvement a été modélisée par une fonction gaussienne dont la largeur était proportionnelle à la taille (la surface) des champs récepteurs sous-jacents. Dans le domaine spectral, ce profil de réponse se caractérise par une distribution du signal sur plusieurs harmoniques. Toutefois en imagerie optique, ce « spectre neuronal » est multiplié par le « spectre hémodynamique » ayant pour effet de réduire l'amplitude aux plus hautes fréquences. En évaluant expérimentalement la réponse à des barres en mouvement et la réponse hémodynamique, il nous a donc semblé possible de calculer à l'inverse, la largeur de la gaussienne en chaque point du cortex. Cet aspect apparaît dans l'équation 9 de l'étude 3a qui montre la relation entre la surface des champs récepteurs et la réponse

d'une barre en mouvement à la 1^e et 2^e harmoniques ainsi que les valeurs de réponse hémodynamique correspondant à ces mêmes fréquences.

De manière inattendue, les valeurs de surface de population de champs récepteurs mesurées via cette équation étaient le plus souvent trop basses, voir négatives ! (résultats non montrés). Cet échec dans l'aboutissement de la validation complète du modèle a pu être causé par plusieurs sources dont la principale pourrait être une mauvaise estimation de la réponse hémodynamique. En effet, plusieurs facteurs lors de l'évaluation ont pu transférer son profil dans les basses fréquences, sous-estimant ainsi les valeurs de surface. Par exemple, aux fréquences les plus hautes (0.25 – 0.5 Hz), le nombre de barres présentées (4) a pu être à l'origine d'une réduction de l'amplitude de la réponse neuronale et vasculaire.

Malgré cela, les spectres des réponses hémodynamiques obtenus avec des barres étaient similaires à ceux obtenus par la transformée de Fourier des réponses hémodynamiques mesurées par la stimulation épisodique (étude 3a, figure 6). Une autre hypothèse pourrait être que le modèle n'ait pas exactement pris en compte la situation physiologique rencontrée telle que la modélisation des champs récepteurs par une gaussienne supposant une réponse indépendante de la direction du mouvement des barres. De plus certains facteurs additifs, qui pourraient être reliés au bruit vasculaire n'ont peut-être pas été considérés (Dumoulin et Wandell, 2008).

Malgré l'impossibilité de réaliser des mesures *absolues*, l'étude 3a (figure 6) et 3b (figure 8) ont exploité le fait que le profil de la réponse hémodynamique était homogène dans le cortex. Ainsi l'évaluation *relative* de la taille des champs récepteurs (équation 12 de l'étude 3a) et de la sélectivité à la direction (équation 6 de l'étude 3b) a pu être possible.

L'estimation de la taille des champs récepteurs est un enjeu majeur en imagerie fonctionnelle. Tout d'abord parce que c'est un paramètre très important en vision, mais aussi parce que contrairement à la position des champs récepteurs (rétinotopie) ou l'orientation, ce paramètre est inaccessible directement. Il est également important de mentionner que du fait de l'arrangement non ordonné des champs récepteurs de neurones adjacents, il est considéré que chaque point du cortex est associé à une population de champs récepteurs dont les limites correspondent à une combinaison de

la taille moyenne et de la dispersion spatiale des champs récepteurs sous-jacents (figure 7 de l'introduction, Dumoulin et Wandell, 2008).

Ainsi, lorsqu'une portion du champ visuel est stimulée, cela provoque une aire d'activation dans le cortex dont la surface dépend de la taille des champs récepteurs et de leur dispersion. Il pourrait donc être à priori possible d'évaluer spatialement la taille des champs récepteurs par ce biais (en supposant une dispersion constante).

La taille des champs récepteurs est également accessible temporellement. En effet, en utilisant des cercles en expansions, (Tootell et al., 1997) ont constaté que la réponse en IRMf était plus courte dans les voxels de l'aire V1 que dans l'aire V3 (figure 27). Ces résultats suggèrent donc des tailles de champs récepteurs plus grandes dans l'aire V3 et ont inspiré (Dumoulin et Wandell, 2008) qui ont modélisé cette réponse avec un système linéaire afin d'évaluer la taille des populations de champs récepteurs. Toutefois, cette approche nécessite une contribution très réduite du bruit (ou une modélisation exacte de son profil temporel) ce qui est pour l'instant impossible en imagerie optique.

Dans cette thèse, la taille des champs récepteurs a pu être investiguée de 2 façons. Dans l'étude 1, les mesures de « diamètres optimaux » ont été supposées reliées à la taille des champs récepteurs. Néanmoins, la contribution de la suppression peut avoir affectée cette mesure. De plus, cette approche ne permet pas de réaliser des « cartes de taille de champs récepteurs » mais plutôt une mesure moyenne par expérience et pour une position unique du champ visuel. Dans l'étude 3a, une analyse temporelle a été employée par le biais de la distribution des réponses dans les hautes harmoniques pour mesurer la taille des champs récepteurs. Contrairement à l'étude 1 et celle de (Dumoulin et Wandell, 2008), cette approche, basée sur la décomposition spectrale, n'a pas nécessité d'ajustement statistique des données.

Malgré cela, contrairement à l'approche de (Dumoulin et Wandell, 2008), l'intégration de la réponse hémodynamique dans le modèle n'a pas encore permis une estimation absolue de la taille des champs récepteurs. Néanmoins, aussi bien dans l'étude 3a que dans l'étude 1, une augmentation de la taille relative des populations de champs récepteurs a été constatée entre les aires 17 et 18 et également dans une moindre mesure, en fonction de l'excentricité.

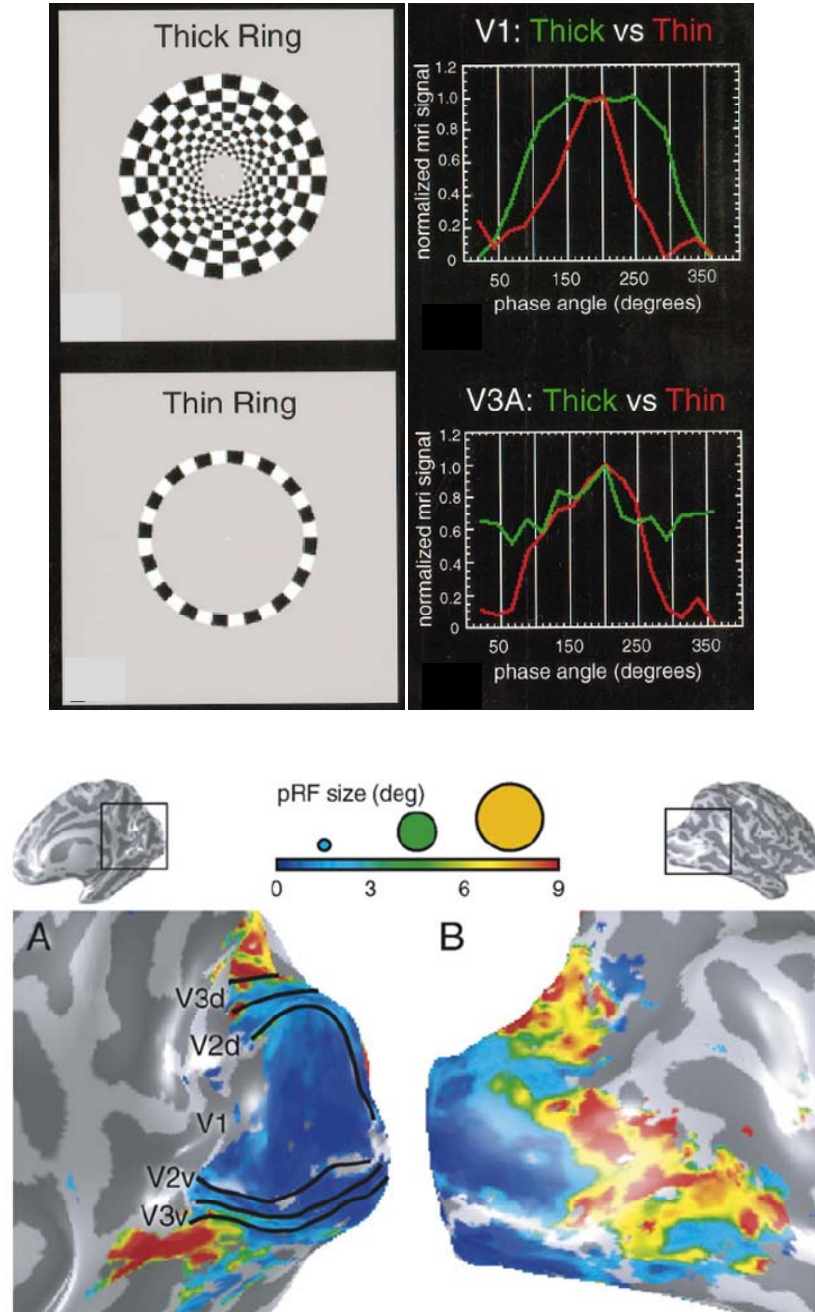


Figure 27. Mesure de la taille des champs récepteurs

(A) Profil du signal dans un voxel en réponse au passage d'un cercle large (vert) ou fin (rouge) mesuré dans l'aire V1 (haut) et V3 (bas) chez l'homme en IRMf. Adaptée de Tootell et al., (1997). (B) Mesures de la taille des champs récepteurs dans les aires V1, V2 et V3 chez l'homme, obtenues à partir d'une modélisation des réponses telles que celles présentées en (A). Adaptée de Dumoulin et Wandell (2008).

6.3.5 Estimation de la direction et de l'orientation

L'analyse multi harmonique, utilisée pour évaluer la taille des champs récepteurs dans l'étude 3a a également été utilisée avec succès dans l'étude 3b pour évaluer la sélectivité à la direction. Alors que la 2^e harmonique seule avait déjà été utilisée pour évaluer la sélectivité à l'orientation en imagerie optique (Zepeda et al., 2004, Kalatsky et Stryker, 2003, Kalatsky, 2009, Jha et al., 2005), la relation entre la 1^e harmonique et la direction n'avait pour l'instant été exploitée qu'en électrophysiologie par (Worgotter et Eysel, 1987). Dans leur étude, la distribution des réponses pour chaque direction, obtenue par des présentations épisodiques des stimuli, avait été analysée par la transformée de Fourier.

La contribution de l'étude 3b est donc d'avoir exploité cette stratégie pour l'imagerie optique dans un mode de présentation continue permettant l'extraction du signal et l'augmentation importante de la qualité des quantifications ce que ne permettait pas les précédentes méthodes (Swindale et al., 2003, Shmuel et Grinvald, 1996, Ribot et al., 2008, Kisvarday et al., 2001, Kim et al., 1999). Toutefois « l'orthogonalité » mesurée entre l'orientation et la direction était moins robuste qu'attendue. De nombreuses causes peuvent avoir été à l'origine de ce résultat :

En réalisant l'analyse de la première harmonique pour définir la direction, cela suppose un profil de réponse sinusoïdale. Dans le principe le calcul de la phase est donc similaire au calcul de la direction préférée par la « somme des vecteurs ». Hors (Swindale, 1998b) a montré que les fonctions sinusoïdales représentaient mal la distribution pour l'orientation. Ainsi, dans l'avenir, les plus hautes harmoniques pourraient être prises en compte pour une modélisation plus adéquate de la phase reliée à la direction.

Une autre hypothèse pourrait provenir d'une contribution de l'orientation au sein de la première harmonique affectant ainsi l'estimation de la phase. Malgré tout, la corrélation de la première harmonique obtenue avec des points en mouvement (minimisant la contribution de l'orientation) avec la deuxième harmonique obtenue avec un réseau statique n'a pas amélioré la relation d'orthogonalité. Pour finir, il est également possible que la contribution du bruit soit plus importante à la fréquence de la 1^e harmonique par rapport à la 2^e affectant ainsi la mesure de la direction.

6.3.6 Simulation continue : application à d'autres modalités

L'extraction du signal associé à une fréquence précise (permettant d'augmenter le rapport signal / bruit) n'est pas le seul avantage de cette nouvelle approche de *stimulation continue*. Son deuxième intérêt majeur est que la *phase* permet d'identifier la *stimulation préférée* pour chaque pixel. Cette force est aussi un de ses points faibles puisque, n'étant adaptée que pour les stimulations continues, elle n'est à priori pas utilisable dans le cadre de la cartographie de paramètre discontinus (Kalatsky, 2009). Néanmoins, une grande majorité des organisations corticales peuvent être considérées comme continues ce qui rend cette approche particulièrement prometteuse.

6.3.6.1 Cartographie unimodale

Dans la plupart des cas en effet, même si le profil de la réponse n'est pas nature sinusoïdale, l'amplitude et la phase à la première harmonique peuvent être exploitées directement lorsque le profil est unimodal (i.e. une réponse par cycle). Ce paradigme a donc été par la suite exploité avec succès pour cartographier la tonotopie dans le cortex auditif du rat (i.e. la carte de préférence pour la tonalité des stimuli sonores (Kalatsky et al., 2005), figure 28). Dans le domaine de la vision, des exportations de ce paradigme pourraient être envisagées telles que pour la couleur ou la fréquence spatiale.

Dans le cas de la fréquence spatiale, la nature non polaire du paramètre pourrait poser le problème de la continuité lors du passage entre les très hautes et les très basses fréquences spatiales. (Kalatsky, 2009) a proposé l'utilisation de « blank » entre chaque cycle. Toutefois, cette solution ne résout pas le problème de continuité, en particulier dans les pixels ayant une réponse de type passe-bas ou passe-haut. Néanmoins, il semble que les domaines de haute et de basse fréquences spatiales ne soient pas adjacents et soient séparés par des fréquences spatiales intermédiaires (Issa et al., 2000). Ainsi la situation ne devrait pas être très différente du cas de la stimula-

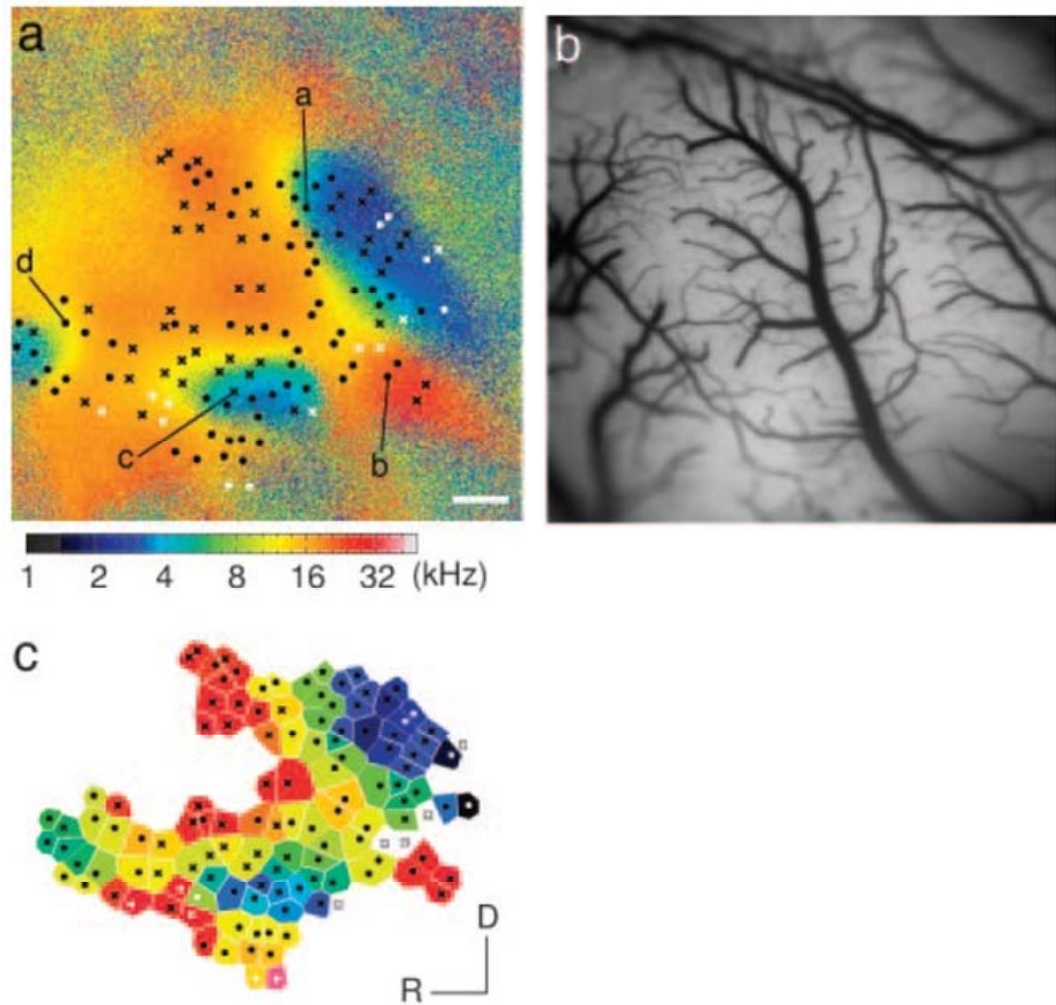


Figure 28. Carte tonotopique

(a) Carte tonotopique obtenue dans le cortex auditif du rat à l'aide de la stimulation continue. (b) Image anatomique du cortex enregistré. (c) Carte tonotopique obtenue dans le même cortex présenté en (a) mais à partir d'enregistrements électrophysiologiques (fréquence sonore optimale). Adaptée de Kalatsky et al. (2005).

tion rétinotopique lorsque la barre, ayant parcouru tout l'écran disparaît, pour réapparaître à une autre place (Kalatsky et Stryker, 2003).

L'adaptation pour des paramètres tels que le contraste ou la réponse à la taille du stimulus (telle qu'utilisé dans l'étude 1) est par contre plus complexe car les profils de réponse sont très différents d'une sinusoïde. Ainsi, une grande quantité d'information devrait être présente aux plus hautes harmoniques et exploitée pour obtenir les informations capitales que sont le « C_{50} » ou le « diamètre optimal ». Cela suppose donc des modélisations plus complexes des profils de réponse.

Il est à noter que dans le cas du contraste, la présentation en « dent de scie » des rampes de contraste pourrait apporter une alternative dans la mesure où les courbes sigmoïdes se retrouveraient en configuration « tête-bêche ». Ainsi, une diminution du C_{50} se traduirait par un élargissement de la largeur de la réponse, accessible simplement via le ratio de la 2^e sur la 1^e harmonique comme cela a été exploité dans l'étude 3a.

6.3.6.2 Estimation de la largeur de bande

Le ratio de la 2^e sur la 1^e harmonique, proposé dans l'étude 3a pour estimer la largeur de réponse a été utilisé avec succès pour mesurer la taille *relative* des populations de champs récepteurs. Dans le principe cette stratégie pourrait s'adapter à d'autres situations dont l'évaluation de la largeur de bande pour l'orientation ou la fréquence spatiale. Néanmoins, les résultats obtenus dans le cadre de l'orientation ont été en contradiction avec notre hypothèse :

Comme on peut le constater dans la figure 2B1 de l'étude 3b, la réponse enregistrée dans l'aire 18 pour un réseau statique montrait une réponse à la 2^e harmonique (i.e. réponse à l'orientation) et à la 4^e harmonique reliée au profil de la réponse (i.e. largeur de bande). Ainsi, si la réponse à l'orientation était considérée comme l'harmonique fondamentale, le ratio de la 4^e sur la 2^e devrait être inversement proportionnel à la largeur de bande pour l'orientation.

Malgré cela, les résultats présentés dans la figure 39 de l'annexe ont révélé une relation positive entre le gradient de la carte d'orientation (indiquant la localisation des « pinwheels ») et ce ratio. En considérant simplement le modèle de l'étude 3a,

cela signifie que la largeur de bande est plus étroite dans les « pinwheels » que dans les domaines ce qui est en contradiction avec l'ensemble des études réalisées à ce sujet ((Swindale et al., 2003, Ohki et al., 2006, Nauhaus et al., 2008) et (Marino et al., 2005, Schummers et al., 2002) dans le cas des composantes infraliminaires). Aucune explication n'a encore pu être apportée pour expliquer ces résultats.

6.3.6.3 Cartographie bimodale

Dans certaines situations le profil de la réponse peut être bimodal (i.e. deux réponses par cycle). On retrouve cette situation dans le cas de la réponse au mouvement où on observe une réponse pour la direction préférée et une autre pour la direction anti-préférée. L'étude 3b a montré que la réponse de la 1^e harmonique était reliée à la direction, la 2^e était reliée à l'orientation et que le ratio des deux permettait de calculer un index de sélectivité bimodale.

Cette méthode a été adaptée avec succès pour mesurer la dominance oculaire dans le cortex visuel primaire des rongeurs. Le paradigme consistait cette fois-ci à stimuler alternativement l'œil droit et l'œil gauche. La première harmonique de la réponse était cette fois-ci reliée à la réponse monoculaire, la 2^e, à la réponse binoculaire et le ratio des deux à un indice de « binocularité » similaire à celui développé par (Cang et al., 2005). Telle que présentée dans l'étude 3b, cette méthode a permis de délimiter clairement les zones binoculaires et monoculaires chez la souris et le rat (Wagor et al., 1980, Schuett et al., 2002, Mangini et Pearlman, 1980, Kalatsky et Stryker, 2003, Gias et al., 2005, Drager, 1975, Cang et al., 2005, Adams et Forrester, 1968).

Toutefois, malgré l'utilisation de différentes techniques de stimulation (LED, valves lumineuses à cristaux liquides, lunettes et stimulation polarisées, ...), cette méthode n'a jamais permis de révéler la moindre carte de dominance oculaire dans le cortex visuel primaire du chat. Ceci a pu être causé par son caractère plus diffus par rapport aux primates (voir chapitre 2.1.5).

En conclusion, les différentes stratégies de stimulation continue sont loin de pouvoir s'adapter à toutes les problématiques et d'offrir un paradigme universel. Néanmoins,

dans les cas où elle peut s'appliquer, le gain de rapport signal / bruit qu'elle offre peut facilement justifier son emploi à la place de méthodes plus classiques.

7 Implications fonctionnelles

7.1 Analyse de l'orientation et de la forme

Les résultats obtenus dans l'étude 2 ont montré la présence de cartes pour l'orientation dans l'aire 21a ayant une organisation spatiale similaire à celles observées dans les aires 17 et 18 (i.e. présence de domaines et de « pinwheels »). En utilisant une méthode de mesure identique, la périodicité des modules d'orientation évaluée dans l'aire 17 était similaire à celle observée par (Rao et al., 1997). Ces mesures étaient également identiques entre les aires 17 et 21a. Ces résultats sont donc en désaccord avec ceux de (Huang et al., 2006) qui avaient constatés une densité de « pinwheels » (inversement reliée à la période) plus importante dans l'aire 21a que dans l'aire 17. Il est à noter que la présence importante de bruit dans leurs cartes peut avoir été à l'origine de « pinwheels artefactuels », augmentant de ce fait la mesure de leur densité (comparez la qualité de cartes de cette étude, figure 29 avec celle de la figure 3F de l'étude 2).

Par contre, l'étude 2 a montré que la période des domaines était plus grande dans l'aire 17 que dans l'aire 18. Ainsi, la présence de champs récepteurs plus grands dans l'aire 18 que dans l'aire 17 ne semble pas avoir de répercussion positive dans la période des modules. De même, malgré la présence de champs récepteurs plus grands dans l'aire 21a par rapport à l'aire 17, aucune différence dans la périodicité n'a été observée. L'existence d'une relation entre la taille des champs récepteurs et la période des modules d'orientation semblerait donc fausse, du moins chez le chat.

L'analyse des modules d'orientation a également permis une estimation indirecte de la largeur de bande à l'orientation dans l'étude 2. (Rao et al., 1997) ont en effet proposé que le taux de chevauchement des modules était proportionnel à la largeur de bande (figure 30). Mais cette analyse n'a montré aucune différence entre les aires 17, 18 et 21a. Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux obtenus par électrophysiologie montrant une largeur de bande plus large dans l'aire 18 que dans l'aire 17 et 21a (Burke et al., 1992, Dreher et al., 1992, Dreher et al., 1993).

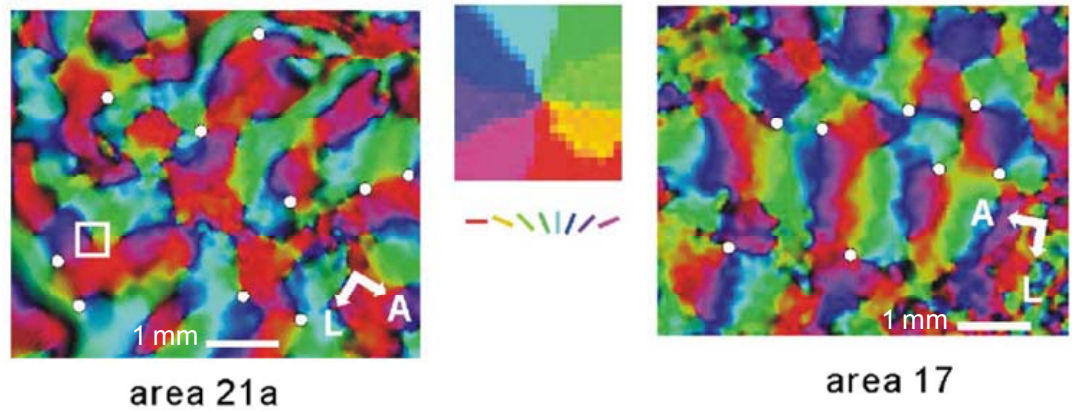


Figure 29. Carte d'orientation dans l'aire 21a

Cartes d'orientations mesurées dans l'aire 21a (à gauche) et l'aire 17 (à droite) dans l'étude de Huang et al. (2006).

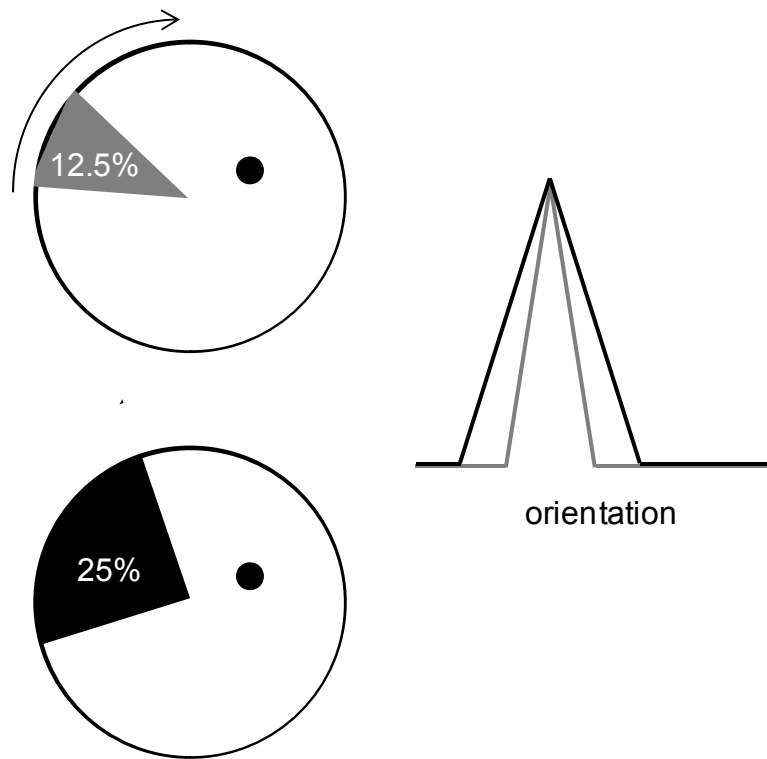


Figure 30. Mesure de la largeur de la réponse en fonction du chevauchement des domaines d'orientation

Schéma montrant la réponse théorique d'un pixel (point) en fonction du taux de chevauchement des domaines d'orientation. Le taux de chevauchement dans le domaine gris (en haut) est plus faible que celui du domaine noir (en bas). Ce taux de chevauchement plus faible est lié au fait que profil de la réponse est plus étroit (voir courbe grise à droite). Inspirée de Rao et al. (1997).

Toutefois, les données obtenues dans l'étude 2 proviennent de l'imagerie optique des signaux intrinsèques qui enregistre en partie l'activité générée par les composantes présynaptiques et infraliminaires. Or, en enregistrant à la fois l'activité infraliminaire et supraliminaire des neurones à l'aide du patch clamp *in vivo*, M. Sur et ses collaborateurs ont montré que la largeur de bande infraliminaire, liée aux entrées synaptiques, était plus large, en particulier à proximité des « pinwheels » (Marino et al., 2005, Schummers et al., 2002). Ainsi, les différences observées dans les comparaisons de largeurs de bande en imagerie optique et en électrophysiologie pourraient dépendre de la présence des composantes présynaptiques et infraliminaires dans le signal.

Aussi bien dans l'étude 2 que dans celle de (Huang et al., 2006), l'amplitude de la réponse à l'orientation dans l'aire 21a était beaucoup plus faible que dans le cortex visuel primaire, en accord avec les études réalisées par électrophysiologie (Dreher et al., 1992, Dreher et al., 1993).

L'amplitude faible pour l'orientation, combinée à une largeur de bande identique (ou plus faible) par rapport aux aires du cortex visuel primaire semble en contradiction avec l'idée que l'aire 21a est optimisée pour le traitement des informations propre à la voie ventrale telle que l'analyse de l'orientation. Néanmoins, l'orientation pourrait à ce stade, représenter un paramètre trop « basique » pour une aire de haut niveau. Ainsi d'autres paramètres plus évolués, tels la forme, pourraient être optimisés au détriment d'autres tels que l'orientation.

7.2 Analyse de la direction

Dans l'étude 2 et 3b, la présence de cartes modulaires pour la direction a pu être révélée dans l'aire 18 en conformité avec les investigations précédemment effectuées par imagerie optique (Kisvarday et al., 2001, Ribot et al., 2008, Shmuel et Grinvald, 1996, Swindale et al., 2003). En employant des réseaux de barres, l'amplitude du signal pour la direction était de l'ordre de 3 fois plus faible que celui pour l'orientation, en accord avec (Shmuel et Grinvald, 1996). Cette réponse réduite peut s'expliquer par la forte contribution des composantes d'orientation du stimulus sur les cellules de l'aire 18 très sélectives à l'orientation. L'emploi de points aléatoires en

mouvement, ne contenant pas de composante d'orientation majoritaire a en effet permis de supprimer cette composante d'orientation et d'augmenter d'un facteur ~ 3 la réponse à la direction.

L'étude 3b (ainsi que d'autres observations non publiées) a systématiquement révélé la présence de cartes de direction au niveau de l'aire 17 du chat malgré que leur présence ne soit pas encore établie avec certitude par la littérature. Jusqu'à maintenant seuls (Kim et al., 1999) et (Weliky et al., 1996) ont pu révéler leur présence dans l'aire 17 du chat et du furet. Par contre, chez les primates, à l'exception d'une faible organisation révélée par (Roe et al., 2005), aucune évidence d'organisation pour la direction ne semble exister dans l'aire V1.

Cette absence théorique de carte de direction serait supportée par le fait que les neurones dans l'aire 17 ont une plus faible sélectivité à la direction que ceux de l'aire 18 (Orban et al., 1981), reçoivent peu de projection Y et participent majoritairement aux processus de la voie ventrale (Lomber, 2001). Cependant, il est à noter que, même si nos études ont révélé un certain niveau d'organisation pour la direction dans l'aire 17, la sélectivité mesurée était toujours plus faible que dans l'aire 18.

Il est important de noter que cette plus faible sélectivité pourrait s'expliquer par le fait que chez le chat adulte, l'accès à l'aire 17 est plus complexe que celui de l'aire 18 limitant parfois l'enregistrement à la zone de transition entre les aires 17 et 18 où les neurones peuvent être « mélangés ». Ainsi, dans cette zone de transition, l'organisation modulaire pour la direction de l'aire 18 pourrait avoir été « diluée » par l'absence éventuelle de carte de direction dans la région adjacente (l'aire 17), réduisant ainsi la mesure de sélectivité.

En conclusion, nos résultats ne permettent pas de révéler avec une complète certitude l'existence ou non de carte de direction dans l'aire 17. Par contre, il semble clair qu'aucune organisation pour la direction n'existe dans l'aire 21a et ce, aussi bien en employant des méthodes conventionnelles (étude 2) que de la stimulation continue (étude 3b) et quelque soit le stimulus employé. Cette observation est en accord avec le fait que les neurones de l'aire 21a sont peu sélectifs à la direction, reçoivent peu d'information du canal Y et semblent plutôt engagés dans des tâches cognitives de la voie ventrale (Lomber, 2001).

Pour conclure, la période des modules d'orientation plus large dans l'aire 17 et 21a que dans l'aire 18 révélée par l'étude 2 pourrait être en accord avec l'hypothèse d'une absence de carte de direction dans ces deux aires de la voie ventrale. En effet, (Farley et al., 2007), ont montré que le retrait de l'organisation pour un paramètre (i.e. la dominance oculaire) s'accompagnait d'une augmentation de la période des modules des autres paramètres (figure 31).

7.3 Analyse centre / pourtour

Lors de leurs expériences, (Born, 2000, Born et Tootell, 1992) ont révélé par marquage au 2-DG la présence de modules pour la suppression par le pourtour dans l'aire MT mais pas dans le cortex visuel primaire du primate. Les résultats obtenus dans l'étude 1 ont par contre révélé à l'aide de l'imagerie optique, la présence de modules de suppression dans le cortex visuel primaire du chat.

Il semblerait donc exister des différences d'organisation corticale pour la modulation centre / pourtour entre ces deux espèces de manière similaire à ce qui est observé pour la direction. En effet, les modules pour la direction et la suppression sembleraient donc absent dans l'aire V1 des primates au profit d'une organisation dans une aire de plus haut niveau (i.e. l'aire MT, (Born, 2000, Born et Tootell, 1992, Malonek et al., 1994, Albright et al., 1984)). Par contre, chez le chat, ces deux types d'organisations sembleraient exister à un stade plus précoce, au niveau du cortex visuel primaire ((Shmuel et Grinvald, 1996) et étude 1).

Deux différences importantes doivent malgré tout être prises en compte dans la comparaison entre l'organisation pour la suppression dans l'aire MT des primates et le cortex visuel primaire du chat. (1) Le type de stimulation employée (points en mouvement vs. réseaux de barres) et la nature des processus de suppression (mouvement vs. orientation) impliquant des mécanismes de suppression différents. (2) Aussi, la nature des techniques était fondamentalement différente. Dans l'étude 1, les organisations modulaires n'ont été révélées que dans des petites portions du cortex à la fois et à partir de la réponse spécifique à l'orientation contrairement aux études de (Born, 2000, Born et Tootell, 1992).

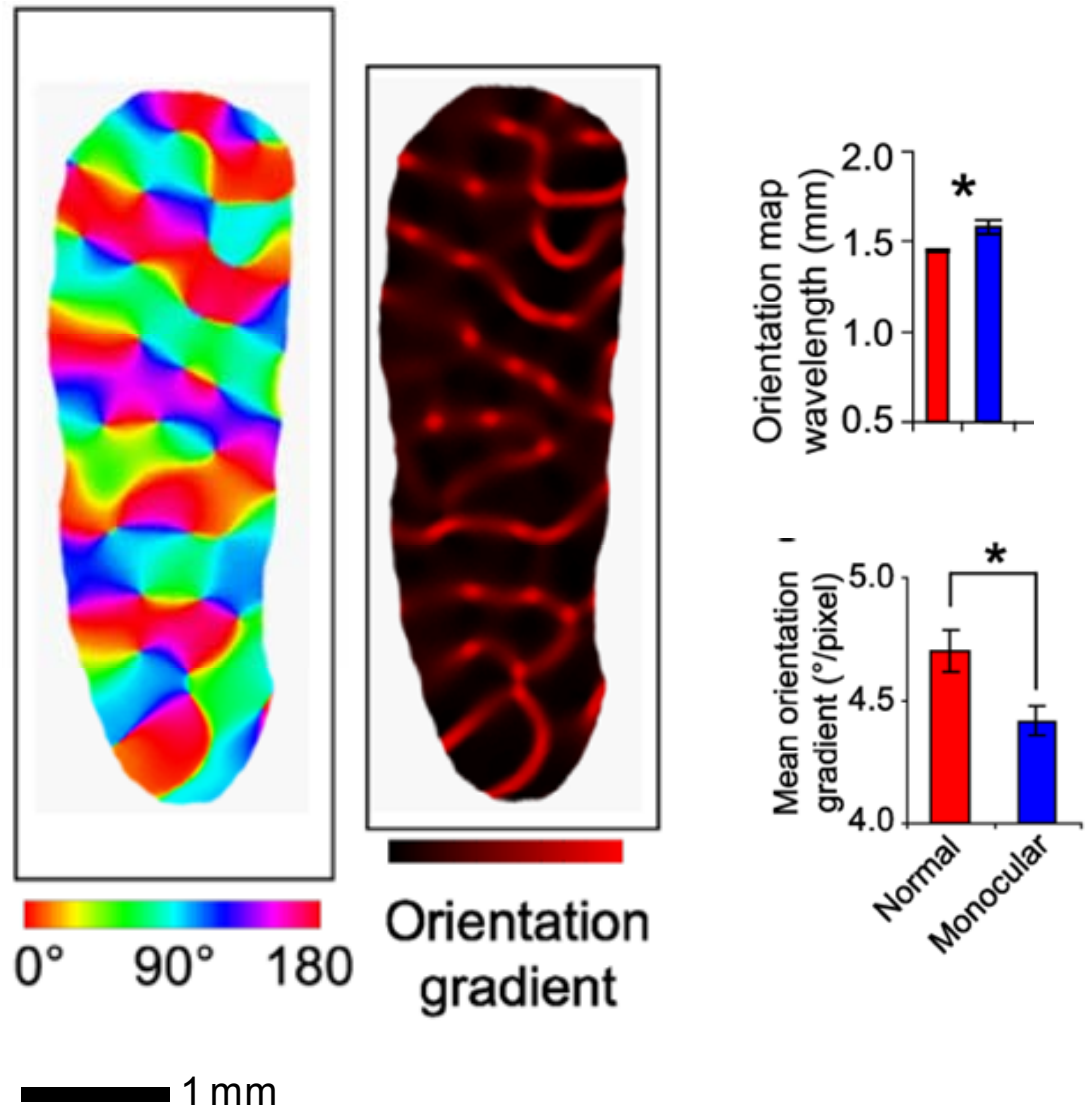


Figure 31. Plasticité de la structure des cartes

(à gauche) Carte d'orientation et (au centre) carte de gradient d'orientation dans le cortex visuel primaire du furet normal. (à droite) Période des modules d'orientation (en haut) et gradient moyen de l'orientation (en bas) chez les animaux normaux (en rouge) et énucléés à la naissance (en bleu, i.e. ne possédant pas de carte de dominance oculaire). Adaptée de Farlay et al. (2007)

7.4 Rôle et origine des cartes

Une grande diversité d'architectures corticales est observée dans le cortex des mammifères et ce, entre structures considérées comme homologues telles que le cortex visuel primaire (voir pour revue : (Van Hooser, 2007)). Dans les aires de bas niveaux, la représentation rétinotopique est toujours présente (Kaas, 1997), mais d'autre organisation peuvent également coexister telles que pour l'orientation ou la dominance oculaire. Le regroupement des neurones de propriétés similaires est considéré comme une stratégie de minimisation de l'étendue des connexions latérales permettant une réduction du volume cérébral, un gain dans la dépense énergétique et une optimisation de l'analyse (Koulakov et Chklovskii, 2001, Chklovskii et Koulakov, 2004, Durbin et Mitchison, 1990).

Toutefois, (Van Hooser, 2007) a discuté le fait que le recours à cette stratégie pourrait éventuellement ne pas affecter la sélectivité des neurones. Par exemple aucune organisation pour la dominance oculaire n'est observée chez la souris (Drager, 1974), le lapin (Hollander et Halbig, 1980), l'écureuil (Weber et al., 1977) ou le toupaye (Humphrey et al., 1977). De plus une étude a montré qu'au sein d'une même espèce de primate, cette organisation pouvait être variable d'un sujet à l'autre (Adams et Horton, 2003). Plus tard le même groupe a révélé que chez ces animaux sans colonne de dominance oculaire, les cellules monoculaires étaient malgré tout présentes (Adams et Horton, 2006).

Néanmoins, polémiquer sur le rôle des cartes en se basant sur l'observation de la dominance oculaire est contradictoire avec l'idée d'une organisation / optimisation *in situ* pour un paramètre. Cette ségrégation oculaire ne correspond finalement qu'à un héritage anatomique en provenance des différentes couches du CGL où les informations des deux yeux sont séparées. Une discussion sur l'organisation de l'*orientation* serait pas contre plus adéquate dans la mesure où cette propriété n'est pas héritée et se base sur une architecture précise des projections des cellules du CGL dans le cortex.

Encore là, de nombreuses espèces ne possèdent pas d'organisation pour l'orientation : c'est le cas du hamster (Tiao et Blakemore, 1976), du lapin ((Murphy et Berman, 1979) et annexe 8.3), de la souris (Metin et al., 1988), de l'écureuil (Van Hooser et

al., 2005) ou du rat (Girman et al., 1999, Ohki et al., 2005). Malgré cette absence, la sélectivité pour l'orientation ne semble pas plus faible que chez les animaux possédant une organisation en domaine comme les carnivores (Grinvald et al., 1986), les primates (Blasdel et Salama, 1986) ou les toupayes (Bosking et al., 1997).

La présence d'une organisation modulaire pourrait donc ne pas être utile dans l'analyse de l'orientation ? Pour réponse à cette question il semble important de prendre en compte les capacités visuelles de ces animaux dans les tâches basées sur l'analyse de l'orientation telle que la reconnaissance des formes. Il est en effet intéressant de constater que ces animaux sans organisation corticale pour l'orientation, n'utilisent pas la vision principalement dans leur comportement. Son rôle est principalement dédié à l'analyse des mouvements (e.g. détection de la présence d'un prédateur), mais beaucoup moins dans l'analyse et la discrimination des objets. Par contre, chez les carnivores et les primates, la vision occupe une place importante et est fortement impliquée dans la discrimination et la localisation impliquant une vision faciale. Cette implication majeure de la vision est également observée chez certains rapaces à vision faciale ayant un comportement de prédateur et chez qui la présence de cartes d'orientation a été constatée (Liu et Pettigrew, 2003). Il semble donc que l'organisation corticale pour l'orientation puisse être liée au comportement de l'animal et à l'origine d'une convergence fonctionnelle entre animaux très distant génétiquement (primates, carnivores et oiseaux).

Ainsi la fonction d'une structure corticale, influencée par le comportement de l'animal pourraient déterminer la présence ou non d'une carte pour un paramètre donné. Jusqu'ici cette description ne s'était limitée qu'au cortex visuel primaire. En ce qui concerne les aires de plus haut niveau, cette théorie semblerait s'appliquer puisqu'une organisation pour la direction semble exister dans l'aire MT des primates (Albright et al., 1984, Malonek et al., 1994, Xu et al., 2004b), fortement impliquée dans l'analyse du mouvement mais pas dans l'aire 21a du chat (étude 2), beaucoup moins impliquée dans l'analyse du mouvement que d'autres structures telles que le PMLS.

Pour finir, si la minimisation de l'étendue des projections latérales est un facteur qui détermine la présence des cartes, on pourrait s'attendre à ce que la taille de la structure corticale puisse également avoir un impact. En prenant l'exemple de l'orientation; pour un état d'optimisation d'analyse égal, la nécessité d'une organisation modulaire pourrait devenir nécessaire lorsque la taille de l'aire corticale devient trop grande. Cet aspect pourrait expliquer l'existence de cartes d'orientation dans le cortex visuel primaire des primates et des carnivores et leur absence chez le rat ou la souris ayant des surfaces de cortex visuel primaire plus petites (voir la figure 23). Toutefois, cette théorie est contradictoire avec l'observation de cartes d'orientation dans le cortex visuel primaire du toupaye mais pas dans celui du lapin alors que leur surface est à peu près similaire (comparez les surfaces d'activation visuelle dans les figures 42 et 45 de l'annexe).

7.5 Études futures

7.5.1 Lésions réversibles

Les propriétés des neurones du cortex visuel primaire proviennent en partie des rétrocontrôles des structures de plus haut niveau. Par exemple, l'inactivation réversible des aires du sulcus suprasylvien, et en particulier du PMLS, a provoqué une réduction de la sélectivité à la direction dans le cortex visuel primaire (Galuske et al., 2002, Shen et al., 2006). Quant à l'inactivation de l'aire 21a, elle a été à l'origine d'une réduction de la sélectivité à l'orientation, sans changement de la sélectivité à la direction et de la suppression centre / pourtour dans le cortex visuel primaire (Huang et al., 2004, Liang et al., 2007, Wang et al., 2000).

Impact du LPI sur l'analyse du mouvement simple dans le cortex visuel primaire

Les neurones du noyau LPI établissent des connexions réciproques avec les neurones du cortex visuel primaire (voir chapitre 1.5 de l'introduction) mais leur rôle n'est pas encore complètement établi. Étant donné la sensibilité à la direction importante dans le LPI, l'étude de l'impact de son inactivation réversible (par injection locale de GABA) sur la sélectivité à la direction des neurones de l'aire 18 pourrait s'avérer forte intéressante. De plus le développement, dans cette thèse, d'une technique rapide

d'enregistrement des cartes de direction permettra de réduire considérablement la durée des inactivations (étude 3b). Ainsi la probabilité d'obtenir un contrôle « post-inactivation » sera maximisée. Enfin, l'utilisation d'une grande chambre d'enregistrement, telle qu'utilisée dans toutes les études de cette thèse permettra d'enregistrer en parallèle le cortex contra-latéral à l'inactivation offrant ainsi un autocontrôle précieux dans cette étude (voir la figure 40 de l'annexe).

Impact du LPI sur l'analyse du mouvement des plaids dans le cortex visuel primaire

Bien que dans une proportion plus faible que dans LPm, une part des neurones du LPI sont capables d'intégrer le mouvement résultant de deux réseaux superposés (*plaids*, (Casanova et al., 2001, Merabet et al., 1998)). Cette capacité n'existe pas dans les neurones des aires corticales de bas niveau telles que dans l'aire 18 où les neurones n'intègrent que les 2 composantes du mouvement indépendamment (Castelo-Branco et al., 2000). Mais récemment, en employant l'imagerie des signaux intrinsèques, (Schmidt et al., 2006) ont montré l'existence d'une organisation corticale pour le mouvement résultant de deux réseaux superposés. Il semblerait donc qu'au niveau de la population et/ou des entrées synaptiques, l'intégration du mouvement global puisse être présente dans une aire de bas niveau. Ainsi, l'étude de l'effet de l'inactivation du LPI sur ces cartes de direction de *plaids* dans l'aire 18 pourra permettre de savoir si cette organisation provient des rétrocontrôles du LPI ou d'autres mécanismes (e.g. intrinsèques à l'aire 18).

Impact du LPI sur l'analyse centre/pourtour dans le cortex visuel primaire

La taille importante des champs récepteurs des neurones du LPI pourrait lui offrir la capacité de participer aux mécanismes d'interaction centre pourtour observé dans le cortex visuel primaire (figure 32). En effet son rôle pourrait être de permettre aux neurones de mettre en relation des stimuli dans des positions très distantes du champ visuel tel que cela semble exister entre l'aire MT et V1 chez les primates (Bullier, 2004, Bullier et al., 2001, Hupe et al., 1998). Les cartes de suppression présentées dans l'étude 1, pourraient ainsi être évaluées suite à l'inactivation réversible du LPI.

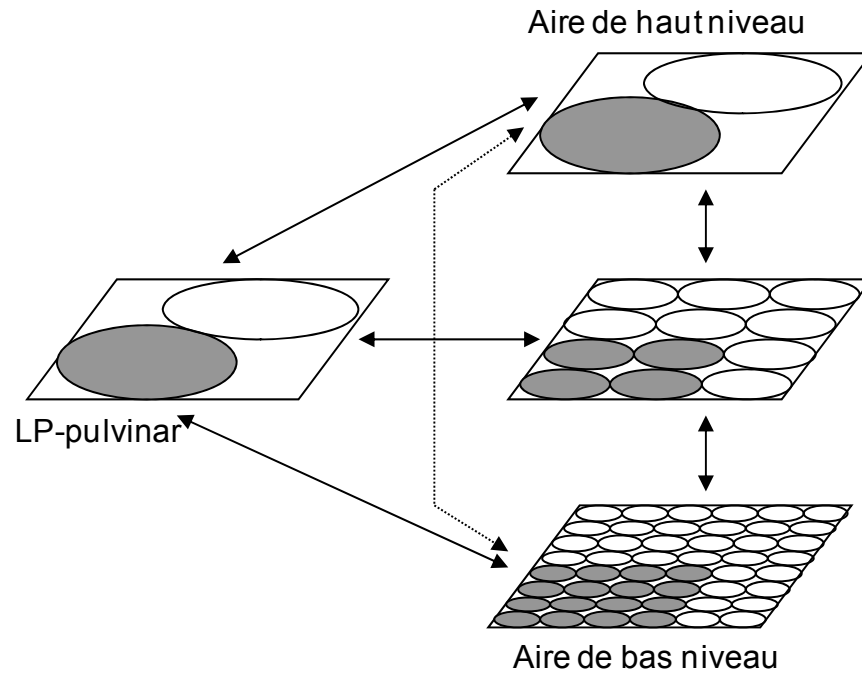


Figure 32. Rôle du LP-pulvinar

Rôle possible du LP-pulvinar dans l'intégration visuelle entre les aires de bas niveau et de haut niveau. Les connexions réciproques du LP-pulvinar avec différentes aires corticales et la grande taille de ses champs récepteurs (cercle gris) peuvent permettre de mettre en relation des stimuli dans des positions distantes du champ visuel. Flèche pointillée : connexion virtuelle que le LP-pulvinar pourrait permettre entre des aires distantes non connectées directement. Adaptée de Casanova et al. (2001).

Effet indirect du PMLS sur le cortex visuel primaire via le LPI

Les neurones du PMLS sont connus pour avoir un impact sur l'analyse du mouvement dans le cortex visuel primaire (Galuske et al., 2002, Shen et al., 2006) et possèdent également de grands champs récepteurs associés à des interactions centre/pourtour. Ils établissent des connexions réciproques avec le cortex visuel primaire mais également avec le LPI. Ainsi, les effets qui pourraient être observés dans les études préalablement proposées pourraient provenir des neurones du PMLS par des connexions indirectes cortico-thalamo-corticales (Payne et Lomber, 2003). Il serait donc envisageable d'étudier l'impact de l'inactivation du LPI sur l'intégration du mouvement simple, des *plaids* et de la suppression en conjonction de l'inactivation couplée du PMLS par injection de GABA ou par l'inactivation par le froid à l'aide d'une « cryoloop » (Galuske et al., 2002).

Impact direct et indirect du cortex visuel primaire sur l'aire 21a

La source principale des entrées fonctionnelles de l'aire 21a provient du cortex visuel primaire (Michalski et al., 1993). Toutefois le rôle respectif de l'aire 17 par rapport à l'aire 18 sur la sélectivité à l'orientation dans l'aire 21a n'a pas encore été étudié. Cette question est d'autant plus intéressante que les rétrocontrôles de l'aire 21a ont un impact plus important sur l'aire 17, que sur l'aire 18 (Huang et al., 2004).

L'impact de l'inactivation réversible de l'aire 17 ou de l'aire 18 sur les cartes d'orientation de l'aire 21a pourrait donc être étudié. Malgré cela, la proximité du cortex visuel primaire et de l'aire 21a imposera de positionner le dispositif d'inactivation (pipette d'injection ou « cryoloop ») au sein même de la chambre d'enregistrement (voir figure 41 de l'annexe).

Tout comme le cortex visuel primaire, l'aire 21a établit des connexions avec le LPI. Ainsi, une partie de l'effet observé pourrait provenir d'interactions cortico-thalamo-corticales dont la contribution pourrait être quantifiée par l'inactivation couplée du LPI par injection de GABA.

7.5.2 Mise en évidence d'une organisation pour la direction dans le PMLS

Le PMLS est une structure fortement impliquée dans l'analyse du mouvement (voir le chapitre 1.3). La notion d'optimisation développée dans le chapitre 7.4 supposerait donc une organisation modulaire pour la direction dans le PMLS similairement à celle observée dans l'aire MT des primates (Albright et al., 1984, Malonek et al., 1994, Xu et al., 2004b).

Toutefois, contrairement à l'aire MT de certains primates, le PMLS est complètement intégré dans le repli d'un sulcus chez le chat (figure 33). Cette structure est de ce fait, inaccessible par l'imagerie optique. Plusieurs alternatives pourraient néanmoins être proposées pour réaliser la cartographie de la direction :

L'aspiration du gyrus ectosylvien donnerait un accès direct au PMLS et à l'AMLS par imagerie optique. Néanmoins cette stratégie serait extrêmement invasive ce qui risquerait de compromettre les enregistrements subséquents. De plus, cette opération va retirer des structures visuelles, telles que le PLLS et l'ALLS, connectées directement ou indirectement avec le PMLS (Scannell et al., 1995). La disposition d'un prisme pourrait aussi être envisagée pour contourner l'aspiration. Cependant, la quantité importante de vaisseaux au sein du sulcus risquerait également de causer de sérieux dommages. Quoiqu'envisageable, l'approche de l'imagerie optique semble donc complexe.

En utilisant un système multi électrodes, (Diogo et al., 2003) ont pu mesurer la sélectivité à la direction dans de nombreuses positions tangentiellement au PMLS. En reconstruisant le parcours des électrodes ils ont ensuite pu réaliser une carte de la sélectivité dans l'aire MT. Cette approche pourrait donc être adaptée pour cartographier la sélectivité à la direction dans le PMLS. Toutefois, cette stratégie nécessite un grand nombre de mesures au sein du même animal et pourrait s'avérer fastidieuse.

Le marquage au 2-DG, suite à la présentation d'une seule direction pourrait permettre de révéler la présence de modules de fort marquage pour cette direction dans le PMLS. Cependant, les modules pourraient provenir d'autres influences telles

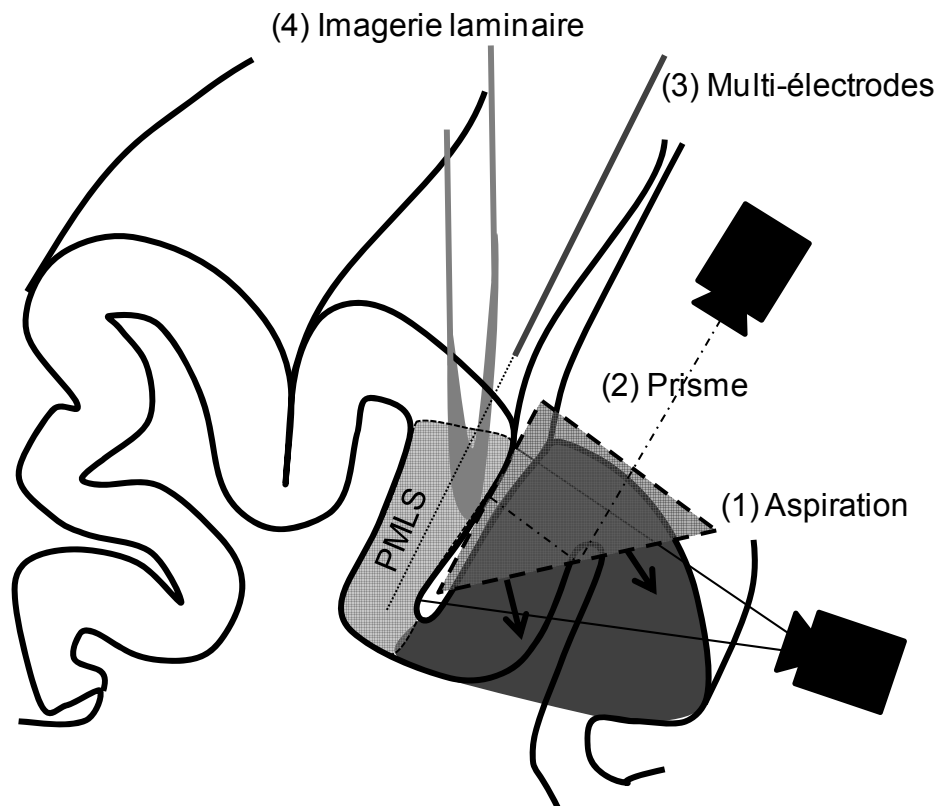


Figure 33. Imagerie du PMLS

Schéma de certaines stratégies pouvant être employées pour cartographier la sélectivité à la direction dans le PMLS : (1) Aspiration du gyrus ectosylvien (gris foncé) associée à l'imagerie optique, (2) disposition d'un prisme dans le sulcus associée à l'imagerie optique, (3) enregistrements tangentiels dans le PMLS à l'aide d'un système de multi-électrodes et (4) imagerie laminaire.

que la suppression par le pourtour similairement à ce qui est observé dans l'aire MT (Born, 2000, Born et Tootell, 1992). Afin de contrôler la spécificité du marquage pour la direction, la confirmation par quelques enregistrements électrophysiologiques pourrait s'avérer nécessaire.

L'imagerie laminaire 3D est probablement un des domaines d'imagerie macroscopique offrant les perspectives les plus prometteuses (Belanger et al., 2010, Hillman et al., 2007). La résolution spatiale (~200µm) sera probablement suffisante pour révéler une organisation en domaine et ce, dans chaque couche corticale indépendamment. Néanmoins, la profondeur des enregistrements n'atteint pour l'instant que 2 mm ce qui est insuffisant pour accéder aux 5 à 6 mm de la profondeur du sulcus. Malgré cela, la mesure pourrait dans un premier temps se limiter au premier tiers supérieur de l'aire corticale.

7.5.3 Carte d'orientation dans l'aire 21a

Dans l'étude 2, l'analyse de l'architecture de la carte d'orientation dans l'aire 21a ne s'est limitée pour l'instant qu'au calcul de sa périodicité et de son taux de chevauchement. Dans l'avenir, les données seront réanalysées afin de permettre d'obtenir de nouvelles informations quant à son organisation fonctionnelle en comparaison des aires 17 et 18.

Par exemple, l'analyse du gradient permettrait d'évaluer si la carte d'orientation subie plus ou moins de contraintes d'uniformité de recouvrement que dans le cortex visuel primaire. Cette valeur pourrait permettre d'estimer théoriquement la quantité de modalités présentes sous la forme de carte. L'analyse de la relation avec les cartes de fréquence spatiale pourrait également être effectuée pour confirmer que le principe d'uniformité de recouvrement est présent également à un plus haut niveau hiérarchique. Toutefois, il est à noter que les cartes de fréquence spatiale ont été acquises en utilisant uniquement deux orientations cardiales. Ainsi l'évaluation de leur organisation spatiale complète ne sera pas facilement accessible.

Dans l'avenir, la mise en évidence des cartes de fréquence spatiale complètes en utilisant le paradigme de stimulation continue pourrait s'avérer utile dans l'aire 21a (voir figures 42 et 43 de l'annexe). La mise en évidence de cartes pour d'autres paramètres pourrait également être envisagée : cartes de rétinotopie, de suppression ou de « forme ».

CONCLUSION

Dans cette thèse, la caractérisation de l'organisation fonctionnelle de plusieurs paramètres, au sein de plusieurs aires visuelles chez le chat, pourra permettre de contribuer à la compréhension de la relations structure / fonction des cartes corticales chez les mammifères et au delà. Les travaux réalisés ici ont permis de montrer qu'à un très bas niveau hiérarchique, dans le cortex visuel primaire, la modulation centre / pourtour semblait déjà être optimisée sous la forme de modules fonctionnels. Une seconde étude a permis de montrer que dans l'aire 21a, impliquée dans l'analyse de la forme, l'orientation était également optimisée sous la forme de modules ce qui n'était pas le cas pour la direction.

Dans le futur, la caractérisation dans des aires visuelles de plus haut niveau hiérarchique chez le chat et dans leurs homologues au sein de différentes espèces pourrait être envisagée. Des résultats préliminaires provenant du toupaye, du lapin, de la souris et du rat sont d'ailleurs présentés dans les annexes de cette thèse.

Toutes les études présentées ici ont été effectuées à l'aide de l'imagerie optique des signaux intrinsèques et une part importante des travaux réalisés durant cette thèse ont permis de contribuer au développement de l'aspect quantitatif de cette approche expérimentale. L'exploitation de l'analyse temporelle, permettant d'augmenter considérablement le rapport signal / bruit, a permis d'accéder à une multitude de paramètres fondamentaux en vision tels que la taille des champs récepteurs ou la sélectivité aux mouvements. Dans le futur, mon souhait serait de voir l'exportation de ce volet technique s'appliquer au delà du domaine de la vision et de l'imagerie optique.

SOURCES DOCUMENTAIRES

- ABRAMSON, B. P. & CHALUPA, L. M. 1985. The laminar distribution of cortical connections with the tecto- and cortico-recipient zones in the cat's lateral posterior nucleus. *Neuroscience*, 15, 81-95.
- ADAMS, A. D. & FORRESTER, J. M. 1968. The projection of the rat's visual field on the cerebral cortex. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 53, 327-36.
- ADAMS, D. L. & HORTON, J. C. 2003. Capricious expression of cortical columns in the primate brain. *Nat Neurosci*, 6, 113-4.
- ADAMS, D. L. & HORTON, J. C. 2006. Monocular cells without ocular dominance columns. *J Neurophysiol*, 96, 2253-64.
- AGUIRRE, A. D., CHEN, Y., FUJIMOTO, J. G., RUVINSKAYA, L., DEVOR, A. & BOAS, D. A. 2006. Depth-resolved imaging of functional activation in the rat cerebral cortex using optical coherence tomography. *Opt Lett*, 31, 3459-61.
- AKASAKI, T., SATO, H., YOSHIMURA, Y., OZEKI, H. & SHIMEGI, S. 2002. Suppressive effects of receptive field surround on neuronal activity in the cat primary visual cortex. *Neurosci Res*, 43, 207-20.
- ALBRIGHT, T. D., DESIMONE, R. & GROSS, C. G. 1984. Columnar organization of directionally selective cells in visual area MT of the macaque. *J Neurophysiol*, 51, 16-31.
- ALBUS, K. & BECKMANN, R. 1980. Second and third visual areas of the cat: interindividual variability in retinotopic arrangement and cortical location. *J Physiol*, 299, 247-76.
- ALLMAN, J., MIEZIN, F. & MCGUINNESS, E. 1985. Direction- and velocity-specific responses from beyond the classical receptive field in the middle temporal visual area (MT). *Perception*, 14, 105-26.
- ANGELUCCI, A., LEVITT, J. B., WALTON, E. J., HUPE, J. M., BULLIER, J. & LUND, J. S. 2002. Circuits for local and global signal integration in primary visual cortex. *J Neurosci*, 22, 8633-46.
- ATTWELL, D. & LAUGHLIN, S. B. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 1133-45.

- BELANGER, S., ABRAN, M., INTES, X., CASANOVA, C. & LESAGE, F. 2010. Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination. *J Biomed Opt*, 15, 016006.
- BERMAN, N. E., WILKES, M. E. & PAYNE, B. R. 1987. Organization of orientation and direction selectivity in areas 17 and 18 of cat cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 58, 676-99.
- BERSON, D. M. & GRAYBIEL, A. M. 1978. Parallel thalamic zones in the LP-pulvinar complex of the cat identified by their afferent and efferent connections. *Brain Res*, 147, 139-48.
- BERWICK, J., MARTIN, C., MARTINDALE, J., JONES, M., JOHNSTON, D., ZHENG, Y., REDGRAVE, P. & MAYHEW, J. 2002. Hemodynamic response in the unanesthetized rat: intrinsic optical imaging and spectroscopy of the barrel cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 670-9.
- BLAKEMORE, C. & ZUMBROICH, T. J. 1987. Stimulus selectivity and functional organization in the lateral suprasylvian visual cortex of the cat. *J Physiol*, 389, 569-603.
- BLASDEL, G. G. 1992a. Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. *J Neurosci*, 12, 3115-38.
- BLASDEL, G. G. 1992b. Orientation selectivity, preference, and continuity in monkey striate cortex. *J Neurosci*, 12, 3139-61.
- BLASDEL, G. G. & SALAMA, G. 1986. Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature*, 321, 579-85.
- BONHOEFFER, T. & GRINVALD, A. 1991. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature*, 353, 429-31.
- BONHOEFFER, T. & GRINVALD, A. 1993. Optical imaging of the functional architecture in cat visual cortex: the layout of direction and orientation domains. *Adv Exp Med Biol*, 333, 57-69.
- BONHOEFFER, T. & GRINVALD, A. 1996. Optical imaging based on intrinsic signal- the methodology. In A. W. Toga and J. C. Mazziotta (Eds) *Brain Mapping: The Methods*.

- BONHOEFFER, T., KIM, D. S., MALONEK, D., SHOHAM, D. & GRINVALD, A. 1995. Optical imaging of the layout of functional domains in area 17 and across the area 17/18 border in cat visual cortex. *Eur J Neurosci*, 7, 1973-88.
- BORN, R. T. 2000. Center-surround interactions in the middle temporal visual area of the owl monkey. *J Neurophysiol*, 84, 2658-69.
- BORN, R. T. & TOOTELL, R. B. 1992. Segregation of global and local motion processing in primate middle temporal visual area. *Nature*, 357, 497-9.
- BOSKING, W. H., ZHANG, Y., SCHOFIELD, B. & FITZPATRICK, D. 1997. Orientation selectivity and the arrangement of horizontal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci*, 17, 2112-27.
- BOSKING WH, CROWLEY JC, FITZPATRICK D. 2002. Spatial coding of position and orientation in primary visual cortex. *Nat Neurosci*. 5(9):874-82.
- BOUCHARD, M. B., CHEN, B. R., BURGESS, S. A. & HILLMAN, E. M. 2009. Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics. *Opt Express*, 17, 15670-8.
- BOYNTON, G. M., ENGEL, S. A., GLOVER, G. H. & HEEGER, D. J. 1996. Linear systems analysis of functional magnetic resonance imaging in human V1. *J Neurosci*, 16, 4207-21.
- BROSSEAU-LACHAINE, O., FAUBERT, J. & CASANOVA, C. 2001. Functional sub-regions for optic flow processing in the posteromedial lateral suprasylvian cortex of the cat. *Cereb Cortex*, 11, 989-1001.
- BULLIER, J. 2004. Communication between cortical areas of the visual system. *The Visual Neuroscience*, MIT press, 1, 522-450.
- BULLIER, J., HUPE, J. M., JAMES, A. C. & GIRARD, P. 2001. The role of feedback connections in shaping the responses of visual cortical neurons. *Prog Brain Res*, 134, 193-204.
- BURKE, W., DREHER, B., MICHALSKI, A., CLELAND, B. G. & ROWE, M. H. 1992. Effects of selective pressure block of Y-type optic nerve fibers on the receptive-field properties of neurons in the striate cortex of the cat. *Vis Neurosci*, 9, 47-64.

- CANG, J., KALATSKY, V. A., LOWEL, S. & STRYKER, M. P. 2005. Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci*, 22, 685-91.
- CARANDINI, M. & SENGPIEL, F. 2004. Contrast invariance of functional maps in cat primary visual cortex. *J Vis*, 4, 130-43.
- CARREIRA-PERPINAN, M. A., LISTER, R. J. & GOODHILL, G. J. 2005. A computational model for the development of multiple maps in primary visual cortex. *Cereb Cortex*, 15, 1222-33.
- CASANOVA, C. 2004. The visual functions of the pulvinar. *The Visual Neuroscience*, MIT press, 1, 592-608.
- CASANOVA, C., FREEMAN, R. D. & NORDMANN, J. P. 1989. Monocular and binocular response properties of cells in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *J Neurophysiol*, 62, 544-57.
- CASANOVA, C., MERABET, L., DESAUTELS, A. & MINVILLE, K. 2001. Higher-order motion processing in the pulvinar. *Prog Brain Res*, 134, 71-82.
- CASANOVA, C. & SAVARD, T. 1996a. Motion sensitivity and stimulus interactions in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Prog Brain Res*, 112, 277-87.
- CASANOVA, C. & SAVARD, T. 1996b. Responses to moving texture patterns of cells in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Neuroscience*, 70, 439-47.
- CASTELO-BRANCO, M., GOEBEL, R., NEUENSCHWANDER, S. & SINGER, W. 2000. Neural synchrony correlates with surface segregation rules. *Nature*, 405, 685-9.
- CAVANAUGH, J. R., BAIR, W. & MOVSHON, J. A. 2002a. Nature and interaction of signals from the receptive field center and surround in macaque V1 neurons. *J Neurophysiol*, 88, 2530-46.
- CAVANAUGH, J. R., BAIR, W. & MOVSHON, J. A. 2002b. Selectivity and spatial distribution of signals from the receptive field surround in macaque V1 neurons. *J Neurophysiol*, 88, 2547-56.

- CHALUPA, L. M. & ABRAMSON, B. P. 1989. Visual receptive fields in the striate-recipient zone of the lateral posterior-pulvinar complex. *J Neurosci*, 9, 347-57.
- CHAPMAN, B. & BONHOEFFER, T. 1998. Overrepresentation of horizontal and vertical orientation preferences in developing ferret area 17. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2609-14.
- CHEN-BEE, C. H., AGONCILLO, T., XIONG, Y. & FROSTIG, R. D. 2007. The triphasic intrinsic signal: implications for functional imaging. *J Neurosci*, 27, 4572-86.
- CHEN, Y., AGUIRRE, A. D., RUVINSKAYA, L., DEVOR, A., BOAS, D. A. & FUJIMOTO, J. G. 2009. Optical coherence tomography (OCT) reveals depth-resolved dynamics during functional brain activation. *J Neurosci Methods*, 178, 162-73.
- CHKLOVSKII, D. B. & KOULAKOV, A. A. 2004. Maps in the brain: what can we learn from them? *Annu Rev Neurosci*, 27, 369-92.
- CONWAY, B., BOYD, J. D., STEWART, T. H. & MATSUBARA, J. A. 2000. The projection from V1 to extrastriate area 21a: a second patchy efferent pathway colocalizes with the CO blob columns in cat visual cortex. *Cereb Cortex*, 10, 149-59.
- COPPOLA, D. M., WHITE, L. E., FITZPATRICK, D. & PURVES, D. 1998. Unequal representation of cardinal and oblique contours in ferret visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2621-3.
- CYNADER, M. S., SWINDALE, N. V. & MATSUBARA, J. A. 1987. Functional topography in cat area 18. *J Neurosci*, 7, 1401-13.
- DAS, A. & GILBERT, C. D. 1995. Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature*, 375, 780-4.
- DAS, A. & GILBERT, C. D. 1997. Distortions of visuotopic map match orientation singularities in primary visual cortex. *Nature*, 387, 594-8.
- DEANGELIS, G. C., FREEMAN, R. D. & OHZAWA, I. 1994. Length and width tuning of neurons in the cat's primary visual cortex. *J Neurophysiol*, 71, 347-74.

- DEANGELIS, G. C., GHOSE, G. M., OHZAWA, I. & FREEMAN, R. D. 1999. Functional micro-organization of primary visual cortex: receptive field analysis of nearby neurons. *J Neurosci*, 19, 4046-64.
- DESIMONE, R. & SCHEIN, S. J. 1987. Visual properties of neurons in area V4 of the macaque: sensitivity to stimulus form. *J Neurophysiol*, 57, 835-68.
- DIOGO, A. C., SOARES, J. G., KOULAKOV, A., ALBRIGHT, T. D. & GATTASS, R. 2003. Electrophysiological imaging of functional architecture in the cortical middle temporal visual area of *Cebus apella* monkey. *J Neurosci*, 23, 3881-98.
- DRAGER, U. C. 1974. Autoradiography of tritiated proline and fucose transported transneuronally from the eye to the visual cortex in pigmented and albino mice. *Brain Res*, 82, 284-92.
- DRAGER, U. C. 1975. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*, 160, 269-90.
- DRAGOI, V., TURCU, C. M. & SUR, M. 2001. Stability of cortical responses and the statistics of natural scenes. *Neuron*, 32, 1181-92.
- DREHER, B., DJAVADIAN, R. L., TURLEJSKI, K. J. & WANG, C. 1996a. Areas PMLS and 21a of cat visual cortex are not only functionally but also hodologically distinct. *Prog Brain Res*, 112, 251-76.
- DREHER, B., MICHALSKI, A., CLELAND, B. G. & BURKE, W. 1992. Effects of selective pressure block of Y-type optic nerve fibers on the receptive-field properties of neurons in area 18 of the visual cortex of the cat. *Vis Neurosci*, 9, 65-78.
- DREHER, B., MICHALSKI, A., HO, R. H., LEE, C. W. & BURKE, W. 1993. Processing of form and motion in area 21a of cat visual cortex. *Vis Neurosci*, 10, 93-115.
- DREHER, B., WANG, C., TURLEJSKI, K. J., DJAVADIAN, R. L. & BURKE, W. 1996b. Areas PMLS and 21a of cat visual cortex: two functionally distinct areas. *Cereb Cortex*, 6, 585-99.

- DUMBRAVA, D., FAUBERT, J. & CASANOVA, C. 2001. Global motion integration in the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Eur J Neurosci*, 13, 2218-26.
- DUMOULIN, S. O. & WANDELL, B. A. 2008. Population receptive field estimates in human visual cortex. *Neuroimage*, 39, 647-60.
- DUNN, A. K., DEVOR, A., DALE, A. M. & BOAS, D. A. 2005. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage*, 27, 279-90.
- DURAND, S., FREEMAN, T. C. & CARANDINI, M. 2007. Temporal properties of surround suppression in cat primary visual cortex. *Vis Neurosci*, 24, 679-90.
- DURBIN, R. & MITCHISON, G. 1990. A dimension reduction framework for understanding cortical maps. *Nature*, 343, 644-7.
- BUZÁS P, VOLGUSHEV M, EYSEL UT, KISVÁRDAY ZF. 2003. Independence of visuotopic representation and orientation map in the visual cortex of the cat. *Eur J Neurosci*. 18(4):957-68.
- EINSTEIN, G. & FITZPATRICK, D. 1991. Distribution and morphology of area 17 neurons that project to the cat's extrastriate cortex. *J Comp Neurol*, 303, 132-49.
- ENGEL, S. A., RUMELHART, D. E., WANDELL, B. A., LEE, A. T., GLOVER, G. H., CHICHILNISKY, E. J. & SHADLEN, M. N. 1994. fMRI of human visual cortex. *Nature*, 369, 525.
- ENROTH-CUGELL, C. & ROBSON, J. G. 1966. The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. *J Physiol*, 187, 517-52.
- EVERSON, R., KNIGHT, B. W. & SIROVICH, L. 1997. Separating spatially distributed response to stimulation from background. I. Optical imaging. *Biol Cybern*, 77, 407-17.
- EVERSON, R. M., PRASHANTH, A. K., GABBAY, M., KNIGHT, B. W., SIROVICH, L. & KAPLAN, E. 1998. Representation of spatial frequency and orientation in the visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8334-8.

- FARLEY, B. J., YU, H., JIN, D. Z. & SUR, M. 2007. Alteration of visual input results in a coordinated reorganization of multiple visual cortex maps. *J Neurosci*, 27, 10299-310.
- FERSTER, D. & MILLER, K. D. 2000. Neural mechanisms of orientation selectivity in the visual cortex. *Annu Rev Neurosci*, 23, 441-71.
- FITZPATRICK, D. 2000. Seeing beyond the receptive field in primary visual cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 438-43.
- FOX, P. T. & RAICHLE, M. E. 1984. Stimulus rate dependence of regional cerebral blood flow in human striate cortex, demonstrated by positron emission tomography. *J Neurophysiol*, 51, 1109-20.
- FOX, P. T. & RAICHLE, M. E. 1986. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 1140-4.
- FOX, P. T., RAICHLE, M. E., MINTUN, M. A. & DENCE, C. 1988. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science*, 241, 462-4.
- FREUND, T. F., MARTIN, K. A. & WHITTERIDGE, D. 1985. Innervation of cat visual areas 17 and 18 by physiologically identified X- and Y- type thalamic afferents. I. Arborization patterns and quantitative distribution of postsynaptic elements. *J Comp Neurol*, 242, 263-74.
- FROSTIG, R. D., LIEKE, E. E., TS'O, D. Y. & GRINVALD, A. 1990. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6082-6.
- FUKUDA, M., MOON, C. H., WANG, P. & KIM, S. G. 2006. Mapping iso-orientation columns by contrast agent-enhanced functional magnetic resonance imaging: reproducibility, specificity, and evaluation by optical imaging of intrinsic signal. *J Neurosci*, 26, 11821-32.
- GABBAY, M., BRENNAN, C., KAPLAN, E. & SIROVICH, L. 2000. A principal components-based method for the detection of neuronal activity maps: application to optical imaging. *Neuroimage*, 11, 313-25.

- GALUSKE, R. A., SCHMIDT, K. E., GOEBEL, R., LOMBER, S. G. & PAYNE, B. R. 2002. The role of feedback in shaping neural representations in cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 17083-8.
- GHOSE, G. M. & TS'O, D. Y. 1997. Form processing modules in primate area V4. *J Neurophysiol*, 77, 2191-6.
- GIAS, C., HEWSON-STOATE, N., JONES, M., JOHNSTON, D., MAYHEW, J. E. & COFFEY, P. J. 2005. Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage*, 24, 200-6.
- GILBERT, C. D. 1977. Laminar differences in receptive field properties of cells in cat primary visual cortex. *J Physiol*, 268, 391-421.
- GILBERT, C. D. & WIESEL, T. N. 1989. Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. *J Neurosci*, 9, 2432-42.
- GIRMAN, S. V., SAUVE, Y. & LUND, R. D. 1999. Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J Neurophysiol*, 82, 301-11.
- GIZZI, M. S., KATZ, E., SCHUMER, R. A. & MOVSHON, J. A. 1990. Selectivity for orientation and direction of motion of single neurons in cat striate and extrastriate visual cortex. *J Neurophysiol*, 63, 1529-43.
- GRANT, S. & HILGETAG, C. C. 2005. Graded classes of cortical connections: quantitative analyses of laminar projections to motion areas of cat extrastriate cortex. *Eur J Neurosci*, 22, 681-96.
- GRANT, S. & SHIPP, S. 1991. Visuotopic organization of the lateral suprasylvian area and of an adjacent area of the ectosylvian gyrus of cat cortex: a physiological and connectional study. *Vis Neurosci*, 6, 315-38.
- GRAYBIEL, A. M. & BERSON, D. M. 1980. Histochemical identification and afferent connections of subdivisions in the lateralis posterior-pulvinar complex and related thalamic nuclei in the cat. *Neuroscience*, 5, 1175-238.
- GRINVALD, A., LIEKE, E., FROSTIG, R. D., GILBERT, C. D. & WIESEL, T. N. 1986. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 324, 361-4.

- HENRY, G. H., LUND, J. S. & HARVEY, A. R. 1978. Cells of the striate cortex projecting to the Clare-Bishop area of the cat. *Brain Res*, 151, 154-8.
- HILL, D. K. & KEYNES, R. D. 1949. Opacity changes in stimulated nerve. *J Physiol*, 108, 278-81.
- HILLMAN, E. M. 2007. Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *J Biomed Opt*, 12, 051402.
- HILLMAN, E. M., DEVOR, A., BOUCHARD, M. B., DUNN, A. K., KRAUSS, G. W., SKOCH, J., BACSKAI, B. J., DALE, A. M. & BOAS, D. A. 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *Neuroimage*, 35, 89-104.
- HOLLANDER, H. & HALBIG, W. 1980. Topography of retinal representation in the rabbit cortex: an experimental study using transneuronal and retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol*, 193, 701-10.
- HUANG, L., CHEN, X. & SHOU, T. 2004. Spatial frequency-dependent feedback of visual cortical area 21a modulating functional orientation column maps in areas 17 and 18 of the cat. *Brain Res*, 998, 194-201.
- HUANG, L., SHOU, T., CHEN, X., YU, H., SUN, C. & LIANG, Z. 2006. Slab-like functional architecture of higher order cortical area 21a showing oblique effect of orientation preference in the cat. *Neuroimage*, 32, 1365-74.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*, 160, 106-54.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. 1977. Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 198, 1-59.
- HUBENER, M., SHOHAM, D., GRINVALD, A. & BONHOEFFER, T. 1997. Spatial relationships among three columnar systems in cat area 17. *J Neurosci*, 17, 9270-84.
- HUMPHREY, A. L., ALBANO, J. E. & NORTON, T. T. 1977. Organization of ocular dominance in tree shrew striate cortex. *Brain Res*, 134, 225-36.
- HUMPHREY, A. L., SUR, M., UHLRICH, D. J. & SHERMAN, S. M. 1985a. Projection patterns of individual X- and Y-cell axons from the lateral geniculate nucleus to cortical area 17 in the cat. *J Comp Neurol*, 233, 159-89.

- HUMPHREY, A. L., SUR, M., UHLRICH, D. J. & SHERMAN, S. M. 1985b. Termination patterns of individual X- and Y-cell axons in the visual cortex of the cat: projections to area 18, to the 17/18 border region, and to both areas 17 and 18. *J Comp Neurol*, 233, 190-212.
- HUPE, J. M., JAMES, A. C., PAYNE, B. R., LOMBER, S. G., GIRARD, P. & BULLIER, J. 1998. Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons. *Nature*, 394, 784-7.
- HUPPE-GOURGUES, F., BICKFORD, M. E., BOIRE, D., PTITO, M. & CASANOVA, C. 2006. Distribution, morphology, and synaptic targets of corticothalamic terminals in the cat lateral posterior-pulvinar complex that originate from the posteromedial lateral suprasylvian cortex. *J Comp Neurol*, 497, 847-63.
- HUSSON, T. R., MALLIK, A. K., ZHANG, J. X. & ISSA, N. P. 2007. Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci*, 27, 8665-75.
- ISSA, N. P., TREPEL, C. & STRYKER, M. P. 2000. Spatial frequency maps in cat visual cortex. *J Neurosci*, 20, 8504-14.
- ITO, M. & GILBERT, C. D. 1999. Attention modulates contextual influences in the primary visual cortex of alert monkeys. *Neuron*, 22, 593-604.
- JHA, S. K., JONES, B. E., COLEMAN, T., STEINMETZ, N., LAW, C. T., GRIFFIN, G., HAWK, J., DABBISH, N., KALATSKY, V. A. & FRANK, M. G. 2005. Sleep-dependent plasticity requires cortical activity. *J Neurosci*, 25, 9266-74.
- JULIEN, C. 2006. The enigma of Mayer waves: Facts and models. *Cardiovasc Res*, 70, 12-21.
- KAAS, J. H. 1997. Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res Bull*, 44, 107-12.
- KALATSKY, V. 2009. Fourier approach for functional imaging. In *Vivo Optical Imaging of Brain Function*, CRC Press, 287-312.
- KALATSKY, V. A., O'CONNOR, E. M., TCHESLAVSKI, G. V. & KALATSKY, V. 2006. Concurrent multidimensional imaging of visual space

representations in mouse visual cortex by Fourier optical imaging of intrinsic signals. SfN abstract, prog. 503.9.

- KALATSKY, V. A., POLLEY, D. B., MERZENICH, M. M., SCHREINER, C. E. & STRYKER, M. P. 2005. Fine functional organization of auditory cortex revealed by Fourier optical imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13325-30.
- KALATSKY, V. A. & STRYKER, M. P. 2003. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron*, 38, 529-45.
- KAPADIA, M. K., WESTHEIMER, G. & GILBERT, C. D. 1999. Dynamics of spatial summation in primary visual cortex of alert monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12073-8.
- KIM, D. S., MATSUDA, Y., OHKI, K., AJIMA, A. & TANAKA, S. 1999. Geometrical and topological relationships between multiple functional maps in cat primary visual cortex. *Neuroreport*, 10, 2515-22.
- KISVARDAY, Z. F., BUZAS, P. & EYSEL, U. T. 2001. Calculating direction maps from intrinsic signals revealed by optical imaging. *Cereb Cortex*, 11, 636-47.
- KOULAKOV, A. A. & CHKLOVSKII, D. B. 2001. Orientation preference patterns in mammalian visual cortex: a wire length minimization approach. *Neuron*, 29, 519-27.
- LEVAY, S. & GILBERT, C. D. 1976. Laminar patterns of geniculocortical projection in the cat. *Brain Res*, 113, 1-19.
- LEVAY, S., HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. 1975. The pattern of ocular dominance columns in macaque visual cortex revealed by a reduced silver stain. *J Comp Neurol*, 159, 559-76.
- LEVAY, S., STRYKER, M. P. & SHATZ, C. J. 1978. Ocular dominance columns and their development in layer IV of the cat's visual cortex: a quantitative study. *J Comp Neurol*, 179, 223-44.
- LEVENTHAL, A. G. 1979. Evidence that the different classes of relay cells of the cat's lateral geniculate nucleus terminate in different layers of the striate cortex. *Exp Brain Res*, 37, 349-72.

- LEVITT, J. B. & LUND, J. S. 1997. Contrast dependence of contextual effects in primate visual cortex. *Nature*, 387, 73-6.
- LIANG, Z., SHEN, W. & SHOU, T. 2007. Enhancement of oblique effect in the cat's primary visual cortex via orientation preference shifting induced by excitatory feedback from higher-order cortical area 21a. *Neuroscience*, 145, 377-83.
- LIU, G. B. & PETTIGREW, J. D. 2003. Orientation mosaic in barn owl's visual Wulst revealed by optical imaging: comparison with cat and monkey striate and extra-striate areas. *Brain Res*, 961, 153-8.
- LOMBER, S. G. 2001. Behavioral cartography of visual functions in cat parietal cortex: areal and laminar dissociations. *Prog Brain Res*, 134, 265-84.
- MACNEIL, M. A., LOMBER, S. G. & PAYNE, B. R. 1997. Thalamic and cortical projections to middle suprasylvian cortex of cats: constancy and variation. *Exp Brain Res*, 114, 24-32.
- MACVICAR, B. A. & HOCHMAN, D. 1991. Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci*, 11, 1458-69.
- MAFFEI, L. & FIORENTINI, A. 1977. Spatial frequency rows in the striate visual cortex. *Vision Res*, 17, 257-64.
- MAHESWARI, R. U., TAKAOKA, H., KADONO, H., HOMMA, R. & TANIFUJI, M. 2003. Novel functional imaging technique from brain surface with optical coherence tomography enabling visualization of depth resolved functional structure in vivo. *J Neurosci Methods*, 124, 83-92.
- MALACH, R., AMIR, Y., HAREL, M. & GRINVALD, A. 1993. Relationship between intrinsic connections and functional architecture revealed by optical imaging and in vivo targeted biocytin injections in primate striate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10469-73.
- MALLIK, A. K., HUSSON, T. R., ZHANG, J. X., ROSENBERG, A. & ISSA, N. P. 2008. The organization of spatial frequency maps measured by cortical flavoprotein autofluorescence. *Vision Res*, 48, 1545-53.
- MALONEK, D. & GRINVALD, A. 1996. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping. *Science*, 272, 551-4.

- MALONEK, D., TOOTELL, R. B. & GRINVALD, A. 1994. Optical imaging reveals the functional architecture of neurons processing shape and motion in owl monkey area MT. *Proc Biol Sci*, 258, 109-19.
- MANGINI, N. J. & PEARLMAN, A. L. 1980. Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse. *J Comp Neurol*, 193, 203-22.
- MARINO, J., SCHUMMERS, J., LYON, D. C., SCHWABE, L., BECK, O., WIESING, P., OBERMAYER, K. & SUR, M. 2005. Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci*, 8, 194-201.
- MARTIN, C., JONES, M., MARTINDALE, J. & MAYHEW, J. 2006. Haemodynamic and neural responses to hypercapnia in the awake rat. *Eur J Neurosci*, 24, 2601-10.
- MAYHEW, J. E., ASKEW, S., ZHENG, Y., PORRILL, J., WESTBY, G. W., REDGRAVE, P., RECTOR, D. M. & HARPER, R. M. 1996. Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage*, 4, 183-93.
- MERABET, L., DESAUTELS, A., MINVILLE, K. & CASANOVA, C. 1998. Motion integration in a thalamic visual nucleus. *Nature*, 396, 265-8.
- MERABET, L., MINVILLE, K., PTITO, M. & CASANOVA, C. 2000. Responses of neurons in the cat posteromedial lateral suprasylvian cortex to moving texture patterns. *Neuroscience*, 97, 611-23.
- METIN, C., GODEMENT, P. & IMBERT, M. 1988. The primary visual cortex in the mouse: receptive field properties and functional organization. *Exp Brain Res*, 69, 594-612.
- MICHALSKI, A., WIMBORNE, B. M. & HENRY, G. H. 1993. The effect of reversible cooling of cat's primary visual cortex on the responses of area 21a neurons. *J Physiol*, 466, 133-56.
- MINTUN, M. A., FOX, P. T. & RAICHLE, M. E. 1989. A highly accurate method of localizing regions of neuronal activation in the human brain with positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9, 96-103.

- MIZOBE, K., ITOI, M., KAIHARA, T. & TOYAMA, K. 1988. Neuronal responsiveness in area 21a of the cat. *Brain Res*, 438, 307-10.
- MOLOTCHNIKOFF S, GILLET PC, SHUMIKHINA S, BOUCHARD M. 2007. Spatial frequency characteristics of nearby neurons in cats' visual cortex. *Neurosci Lett*. 18;418(3):242-7. Epub 2007 Mar 23.
- MONTERO, V. M. 1981. Topography of the cortico-cortical connections from the striate cortex in the cat. *Brain Behav Evol*, 18, 194-218.
- MORLEY, J. W. & VICKERY, R. M. 1997. Spatial and temporal frequency selectivity of cells in area 21a of the cat. *J Physiol*, 501 (Pt 2), 405-13.
- MOVSHON, J. A., THOMPSON, I. D. & TOLHURST, D. J. 1978. Spatial and temporal contrast sensitivity of neurones in areas 17 and 18 of the cat's visual cortex. *J Physiol*, 283, 101-20.
- MURPHY, E. H. & BERMAN, N. 1979. The rabbit and the cat: a comparison of some features of response properties of single cells in the primary visual cortex. *J Comp Neurol*, 188, 401-27.
- NAITO, T., SADAKANE, O., OKAMOTO, M. & SATO, H. 2007. Orientation tuning of surround suppression in lateral geniculate nucleus and primary visual cortex of cat. *Neuroscience*, 149, 962-75.
- NAUHAUS, I., BENUCCI, A., CARANDINI, M. & RINGACH, D. L. 2008. Neuronal selectivity and local map structure in visual cortex. *Neuron*, 57, 673-9.
- NORITA, M., KASE, M., HOSHINO, K., MEGURO, R., FUNAKI, S., HIRANO, S. & MCHAFFIE, J. G. 1996. Extrinsic and intrinsic connections of the cat's lateral suprasylvian visual area. *Prog Brain Res*, 112, 231-50.
- OBERMAYER, K. & BLASDEL, G. G. 1993. Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *J Neurosci*, 13, 4114-29.
- OBRIG, H., NEUFANG, M., WENZEL, R., KOHL, M., STEINBRINK, J., EINHAUPL, K. & VILLRINGER, A. 2000. Spontaneous low frequency oscillations of cerebral hemodynamics and metabolism in human adults. *Neuroimage*, 12, 623-39.

- OGAWA, S., LEE, T. M., KAY, A. R. & TANK, D. W. 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9868-72.
- OGAWA, S., TANK, D. W., MENON, R., ELLERMANN, J. M., KIM, S. G., MERKLE, H. & UGURBIL, K. 1992. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5951-5.
- OHKI, K., CHUNG, S., CH'NG, Y. H., KARA, P. & REID, R. C. 2005. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature*, 433, 597-603.
- OHKI, K., CHUNG, S., KARA, P., HUBENER, M., BONHOEFFER, T. & REID, R. C. 2006. Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels. *Nature*, 442, 925-8.
- OHKI, K., MATSUDA, Y., AJIMA, A., KIM, D. S. & TANAKA, S. 2000. Arrangement of orientation pinwheel centers around area 17/18 transition zone in cat visual cortex. *Cereb Cortex*, 10, 593-601.
- ORBAN, G. A., KENNEDY, H. & MAES, H. 1981. Response to movement of neurons in areas 17 and 18 of the cat: direction selectivity. *J Neurophysiol*, 45, 1059-73.
- OUELLETTE, B. G., MINVILLE, K., FAUBERT, J. & CASANOVA, C. 2004. Simple and complex visual motion response properties in the anterior medial bank of the lateral suprasylvian cortex. *Neuroscience*, 123, 231-45.
- OZEKI, H., SADAKANE, O., AKASAKI, T., NAITO, T., SHIMEGI, S. & SATO, H. 2004. Relationship between excitation and inhibition underlying size tuning and contextual response modulation in the cat primary visual cortex. *J Neurosci*, 24, 1428-38.
- PALMER, L. A., ROSENQUIST, A. C. & TUSA, R. J. 1978. The retinotopic organization of lateral suprasylvian visual areas in the cat. *J Comp Neurol*, 177, 237-56.
- PAYNE, B. R. 1993. Evidence for visual cortical area homologs in cat and macaque monkey. *Cereb Cortex*, 3, 1-25.

- PAYNE, B. R. & LOMBER, S. G. 2003. Quantitative analyses of principal and secondary compound parieto-occipital feedback pathways in cat. *Exp Brain Res*, 152, 420-33.
- POLAT, U., MIZOBE, K., PETTET, M. W., KASAMATSU, T. & NORCIA, A. M. 1998. Collinear stimuli regulate visual responses depending on cell's contrast threshold. *Nature*, 391, 580-4.
- POLIMENI, J. R., GRANQUIST-FRASER, D., WOOD, R. J. & SCHWARTZ, E. L. 2005. Physical limits to spatial resolution of optical recording: clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4158-63.
- POURATIAN, N., SHETH, S. A., MARTIN, N. A. & TOGA, A. W. 2003. Shedding light on brain mapping: advances in human optical imaging. *Trends Neurosci*, 26, 277-82.
- PURUSHOTHAMAN, G., KHAYTIN, I. & CASAGRANDE, V. A. 2009. Quantification of optical images of cortical responses for inferring functional maps. *J Neurophysiol*, 101, 2708-24.
- RACZKOWSKI, D. & ROSENQUIST, A. C. 1983. Connections of the multiple visual cortical areas with the lateral posterior-pulvinar complex and adjacent thalamic nuclei in the cat. *J Neurosci*, 3, 1912-42.
- RAO, S. C., TOTH, L. J. & SUR, M. 1997. Optically imaged maps of orientation preference in primary visual cortex of cats and ferrets. *J Comp Neurol*, 387, 358-70.
- RECTOR, D. M., CARTER, K. M., VOLEGOV, P. L. & GEORGE, J. S. 2005. Spatio-temporal mapping of rat whisker barrels with fast scattered light signals. *Neuroimage*, 26, 619-27.
- REID, R. C. & ALONSO, J. M. 1995. Specificity of monosynaptic connections from thalamus to visual cortex. *Nature*, 378, 281-4.
- RIBOT, J., TANAKA, S., O'HASHI, K. & AJIMA, A. 2008. Anisotropy in the representation of direction preferences in cat area 18. *Eur J Neurosci*, 27, 2773-80.

- RIBOT, J., TANAKA, S., TANAKA, H. & AJIMA, A. 2006. Online analysis method for intrinsic signal optical imaging. *J Neurosci Methods*, 153, 8-20.
- ROE, A. W., FRITSCHES, K. & PETTIGREW, J. D. 2005. Optical imaging of functional organization of V1 and V2 in marmoset visual cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 287, 1213-25.
- ROY, C. S. & SHERRINGTON, C. S. 1890. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol*, 11, 85-158 17.
- SCANNELL, J. W., BLAKEMORE, C. & YOUNG, M. P. 1995. Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex. *J Neurosci*, 15, 1463-83.
- SCANNELL, J. W., BURNS, G. A., HILGETAG, C. C., O'NEIL, M. A. & YOUNG, M. P. 1999. The connectional organization of the cortico-thalamic system of the cat. *Cereb Cortex*, 9, 277-99.
- SCANNELL, J. W., SENGPIEL, F., TOVEE, M. J., BENSON, P. J., BLAKEMORE, C. & YOUNG, M. P. 1996. Visual motion processing in the anterior ectosylvian sulcus of the cat. *J Neurophysiol*, 76, 895-907.
- SCENIAK, M. P., RINGACH, D. L., HAWKEN, M. J. & SHAPLEY, R. 1999. Contrast's effect on spatial summation by macaque V1 neurons. *Nat Neurosci*, 2, 733-9.
- SCHMIDT, K. E., CASTELO-BRANCO, M., GOEBEL, R., PAYNE, B. R., LOMBER, S. G. & GALUSKE, R. A. 2006. Pattern motion selectivity in population responses of area 18. *Eur J Neurosci*, 24, 2363-74.
- SCHUETT, S., BONHOEFFER, T. & HUBENER, M. 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci*, 22, 6549-59.
- SCHUMMERS, J., MARINO, J. & SUR, M. 2002. Synaptic integration by V1 neurons depends on location within the orientation map. *Neuron*, 36, 969-78.
- SENGPIEL, F., SEN, A. & BLAKEMORE, C. 1997. Characteristics of surround inhibition in cat area 17. *Exp Brain Res*, 116, 216-28.
- SHATZ, C. J. & STRYKER, M. P. 1978. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol*, 281, 267-83.

- SHEN, W., LIANG, Z., CHEN, X. & SHOU, T. 2006. Posteromedial lateral suprasylvian motion area modulates direction but not orientation preference in area 17 of cats. *Neuroscience*, 142, 905-16.
- SHIBUKI, K., HISHIDA, R., MURAKAMI, H., KUDOH, M., KAWAGUCHI, T., WATANABE, M., WATANABE, S., KOUUCHI, T. & TANAKA, R. 2003. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol*, 549, 919-27.
- SHIPP, S. & GRANT, S. 1991. Organization of reciprocal connections between area 17 and the lateral suprasylvian area of cat visual cortex. *Vis Neurosci*, 6, 339-55.
- SHMUEL, A. & GRINVALD, A. 1996. Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *J Neurosci*, 16, 6945-64.
- SHOHAM, D., GLASER, D. E., ARIELI, A., KENET, T., WIJNBERGEN, C., TOLEDO, Y., HILDESHEIM, R. & GRINVALD, A. 1999. Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron*, 24, 791-802.
- SHOHAM, D., HUBENER, M., SCHULZE, S., GRINVALD, A. & BONHOEFFER, T. 1997. Spatio-temporal frequency domains and their relation to cytochrome oxidase staining in cat visual cortex. *Nature*, 385, 529-33.
- SHTOYERMAN, E., ARIELI, A., SLOVIN, H., VANZETTA, I. & GRINVALD, A. 2000. Long-term optical imaging and spectroscopy reveal mechanisms underlying the intrinsic signal and stability of cortical maps in V1 of behaving monkeys. *J Neurosci*, 20, 8111-21.
- SIROVICH, L. & KAPLAN, E. 2002. Analysis Methods for Optical Imaging. In *Vivo Optical Imaging of Brain Function*, CRC Press.
- SIROVICH, L. & UGLESICH, R. 2004. The organization of orientation and spatial frequency in primary visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16941-6.
- SMETTERS, D., MAJEWSKA, A. & YUSTE, R. 1999. Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods*, 18, 215-21.

- SOKOLOFF, L., REIVICH, M., KENNEDY, C., DES ROSIERS, M. H., PATLAK, C. S., PETTIGREW, K. D., SAKURADA, O. & SHINOHARA, M. 1977. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, 28, 897-916.
- SORNBORGER, A., SAILSTAD, C., KAPLAN, E. & SIROVICH, L. 2003. Spatiotemporal analysis of optical imaging data. *Neuroimage*, 18, 610-21.
- SORNBORGER, A., YOKOO, T., DELORME, A., SAILSTAD, C. & SIROVICH, L. 2005. Extraction of the average and differential dynamical response in stimulus-locked experimental data. *J Neurosci Methods*, 141, 223-9.
- SPEAR, P. D. 1991. Functions of extrastriate visual cortex in non-primate species. *The Neural Basis of Visual Function*, 4.
- STETTER, M., SCHIESSL, I., OTTO, T., SENGPIEL, F., HUBENER, M., BONHOEFFER, T. & OBERMAYER, K. 2000. Principal component analysis and blind separation of sources for optical imaging of intrinsic signals. *Neuroimage*, 11, 482-90.
- STEWART, T. H., BOYD, J. D. & MATSUBARA, J. A. 2000. Organization of efferent neurons in area 19: the projection to extrastriate area 21a. *Brain Res*, 881, 47-56.
- STONE, J. & DREHER, B. 1973. Projection of X- and Y-cells of the cat's lateral geniculate nucleus to areas 17 and 18 of visual cortex. *J Neurophysiol*, 36, 551-67.
- STOSIEK, C., GARASCHUK, O., HOLTTHOFF, K. & KONNERTH, A. 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7319-24.
- SWINDALE, N. 2001. Cortical cartography: what's in a map? *Curr Biol*, 11, R764-7.
- SWINDALE, N. V. 1998a. Cortical organization: modules, polymaps and mosaics. *Curr Biol*, 8, R270-3.
- SWINDALE, N. V. 1998b. Orientation tuning curves: empirical description and estimation of parameters. *Biol Cybern*, 78, 45-56.

- SWINDALE, N. V. 2000. How many maps are there in visual cortex? *Cereb Cortex*, 10, 633-43.
- SWINDALE, N. V. 2004. How different feature spaces may be represented in cortical maps. *Network*, 15, 217-42.
- SWINDALE, N. V., GRINVALD, A. & SHMUEL, A. 2003. The spatial pattern of response magnitude and selectivity for orientation and direction in cat visual cortex. *Cereb Cortex*, 13, 225-38.
- SWINDALE, N. V., MATSUBARA, J. A. & CYNADER, M. S. 1987. Surface organization of orientation and direction selectivity in cat area 18. *J Neurosci*, 7, 1414-27.
- SWINDALE, N. V., SHOHAM, D., GRINVALD, A., BONHOEFFER, T. & HUBENER, M. 2000. Visual cortex maps are optimized for uniform coverage. *Nat Neurosci*, 3, 822-6.
- SYMONDS, L. L. & ROSENQUIST, A. C. 1984a. Corticocortical connections among visual areas in the cat. *J Comp Neurol*, 229, 1-38.
- SYMONDS, L. L. & ROSENQUIST, A. C. 1984b. Laminar origins of visual corticocortical connections in the cat. *J Comp Neurol*, 229, 39-47.
- SYMONDS, L. L., ROSENQUIST, A. C., EDWARDS, S. B. & PALMER, L. A. 1981. Projections of the pulvinar-lateral posterior complex to visual cortical areas in the cat. *Neuroscience*, 6, 1995-2020.
- TACHTSIDIS, I., ELWELL, C. E., LEUNG, T. S., LEE, C. W., SMITH, M. & DELPY, D. T. 2004. Investigation of cerebral haemodynamics by near-infrared spectroscopy in young healthy volunteers reveals posture-dependent spontaneous oscillations. *Physiol Meas*, 25, 437-45.
- TARDIF, E., BERGERON, A., LEPORE, F. & GUILLEMOT, J. P. 1996. Spatial and temporal frequency tuning and contrast sensitivity of single neurons in area 21a of the cat. *Brain Res*, 716, 219-23.
- THOMPSON, J. K., PETERSON, M. R. & FREEMAN, R. D. 2003. Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex. *Science*, 299, 1070-2.

- THOMPSON, J. K., PETERSON, M. R. & FREEMAN, R. D. 2004. High-resolution neurometabolic coupling revealed by focal activation of visual neurons. *Nat Neurosci*, 7, 919-20.
- THOMPSON, J. K., PETERSON, M. R. & FREEMAN, R. D. 2005. Separate spatial scales determine neural activity-dependent changes in tissue oxygen within central visual pathways. *J Neurosci*, 25, 9046-58.
- TIAO, Y. C. & BLAKEMORE, C. 1976. Functional organization in the visual cortex of the golden hamster. *J Comp Neurol*, 168, 459-81.
- TOHMI, M., KITaura, H., KOMAGATA, S., KUDOH, M. & SHIBUKI, K. 2006. Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. *J Neurosci*, 26, 11775-85.
- TOLHURST, D. J. & THOMPSON, I. D. 1982. Organization of neurones preferring similar spatial frequencies in cat striate cortex. *Exp Brain Res*, 48, 217-27.
- TOLIAS, A. S., KELIRIS, G. A., SMIRNAKIS, S. M. & LOGOTHETIS, N. K. 2005. Neurons in macaque area V4 acquire directional tuning after adaptation to motion stimuli. *Nat Neurosci*, 8, 591-3.
- TONG, L., KALIL, R. E. & SPEAR, P. D. 1982. Thalamic projections to visual areas of the middle suprasylvian sulcus in the cat. *J Comp Neurol*, 212, 103-17.
- TOOTELL, R. B., MENDOLA, J. D., HADJIKHANI, N. K., LEDDEN, P. J., LIU, A. K., REPPAS, J. B., SERENO, M. I. & DALE, A. M. 1997. Functional analysis of V3A and related areas in human visual cortex. *J Neurosci*, 17, 7060-78.
- TOOTELL, R. B., SILVERMAN, M. S. & DE VALOIS, R. L. 1981. Spatial frequency columns in primary visual cortex. *Science*, 214, 813-5.
- TOTH, L. J., RAO, S. C., KIM, D. S., SOMERS, D. & SUR, M. 1996. Subthreshold facilitation and suppression in primary visual cortex revealed by intrinsic signal imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9869-74.
- TOYAMA, K., MIZOBE, K., AKASE, E. & KAIHARA, T. 1994. Neuronal responsiveness in areas 19 and 21a, and the posteromedial lateral suprasylvian cortex of the cat. *Exp Brain Res*, 99, 289-301.

- TS'O, D. Y., FROSTIG, R. D., LIEKE, E. E. & GRINVALD, A. 1990. Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging. *Science*, 249, 417-20.
- TUSA, R. J. & PALMER, L. A. 1980. Retinotopic organization of areas 20 and 21 in the cat. *J Comp Neurol*, 193, 147-64.
- TUSA, R. J., PALMER, L. A. & ROSENQUIST, A. C. 1978. The retinotopic organization of area 17 (striate cortex) in the cat. *J Comp Neurol*, 177, 213-35.
- TUSA, R. J., ROSENQUIST, A. C. & PALMER, L. A. 1979. Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol*, 185, 657-78.
- UNGERLEIDER, L. G. & MISHKIN, M. 1982. Two cortical visual system. Analysis of visual behaviour, MIT press, 549-586.
- UPDYKE, B. V. 1977. Topographic organization of the projections from cortical areas 17, 18 and 19 onto the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol*, 173, 81-122.
- UPDYKE, B. V. 1981. Projections from visual areas of the middle suprasylvian sulcus onto the lateral posterior complex and adjacent thalamic nuclei in cat. *J Comp Neurol*, 201, 477-506.
- UPDYKE, B. V. 1983. A reevaluation of the functional organization and cytoarchitecture of the feline lateral posterior complex, with observations on adjoining cell groups. *J Comp Neurol*, 219, 143-81.
- VAJDA, I., LANKHEET, M. J., BORGHUIS, B. G. & VAN DE GRIND, W. A. 2004. Dynamics of directional selectivity in area 18 and PMLS of the cat. *Cereb Cortex*, 14, 759-67.
- VAN HOOSER, S. D. 2007. Similarity and diversity in visual cortex: is there a unifying theory of cortical computation? *Neuroscientist*, 13, 639-56.
- VAN HOOSER, S. D., HEIMEL, J. A., CHUNG, S., NELSON, S. B. & TOTH, L. J. 2005. Orientation selectivity without orientation maps in visual cortex of a highly visual mammal. *J Neurosci*, 25, 19-28.
- VANDUFFEL, W., TOOTELL, R. B., SCHOUPS, A. A. & ORBAN, G. A. 2002. The organization of orientation selectivity throughout macaque visual cortex. *Cereb Cortex*, 12, 647-62.

- VANZETTA, I. & GRINVALD, A. 2008. Coupling between neuronal activity and microcirculation: implications for functional brain imaging. *HFSP J*, 2, 79-98.
- VANZETTA, I., HILDESHEIM, R. & GRINVALD, A. 2005. Compartment-resolved imaging of activity-dependent dynamics of cortical blood volume and oximetry. *J Neurosci*, 25, 2233-44.
- VILLENEUVE, M. Y. & CASANOVA, C. 2003. On the use of isoflurane versus halothane in the study of visual response properties of single cells in the primary visual cortex. *J Neurosci Methods*, 129, 19-31.
- VILLENEUVE, M. Y., PTITO, M. & CASANOVA, C. 2006. Global motion integration in the postero-medial part of the lateral suprasylvian cortex in the cat. *Exp Brain Res*, 172, 485-97.
- VON GRUNAU, M. & FROST, B. J. 1983. Double-opponent-process mechanism underlying RF-structure of directionally specific cells of cat lateral suprasylvian visual area. *Exp Brain Res*, 49, 84-92.
- WAGOR, E., MANGINI, N. J. & PEARLMAN, A. L. 1980. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse. *J Comp Neurol*, 193, 187-202.
- WANG, C. & DREHER, B. 1996. Binocular interactions and disparity coding in area 21a of cat extrastriate visual cortex. *Exp Brain Res*, 108, 257-72.
- WANG, C., WALESZCZYK, W. J., BURKE, W. & DREHER, B. 2000. Modulatory influence of feedback projections from area 21a on neuronal activities in striate cortex of the cat. *Cereb Cortex*, 10, 1217-32.
- WANG, C., WALESZCZYK, W. J., BURKE, W. & DREHER, B. 2007. Feedback signals from cat's area 21a enhance orientation selectivity of area 17 neurons. *Exp Brain Res*, 182, 479-90.
- WEBER, J. T., CASAGRANDE, V. A. & HARTING, J. K. 1977. Transneuronal transport of [3H]proline within the visual system of the grey squirrel. *Brain Res*, 129, 346-52.
- WELIKY, M., BOSKING, W. H. & FITZPATRICK, D. 1996. A systematic map of direction preference in primary visual cortex. *Nature*, 379, 725-8.

- WHITE, L. E., BOSKING, W. H. & FITZPATRICK, D. 2001. Consistent mapping of orientation preference across irregular functional domains in ferret visual cortex. *Vis Neurosci*, 18, 65-76.
- WIELAARD, J. & SAJDA, P. 2006. Extraclassical receptive field phenomena and short-range connectivity in V1. *Cereb Cortex*, 16, 1531-45.
- WIMBORNE, B. M. & HENRY, G. H. 1992. Response characteristics of the cells of cortical area 21a of the cat with special reference to orientation specificity. *J Physiol*, 449, 457-78.
- WOMELSDORF, T., EYSEL, U. T. & KISVARDAY, Z. F. 2001. Comparison of orientation maps obtained with different number of stimulus orientations. *Neuroimage*, 13, 1131-9.
- WORGOTTER, F. & EYSEL, U. T. 1987. Quantitative determination of orientational and directional components in the response of visual cortical cells to moving stimuli. *Biol Cybern*, 57, 349-55.
- XU, X., ANDERSON, T. J. & CASAGRANDE, V. A. 2007. How do functional maps in primary visual cortex vary with eccentricity? *J Comp Neurol*, 501, 741-55.
- XU, X., BOSKING, W., SARY, G., STEFANSIC, J., SHIMA, D. & CASAGRANDE, V. 2004a. Functional organization of visual cortex in the owl monkey. *J Neurosci*, 24, 6237-47.
- XU, X., BOSKING, W. H., WHITE, L. E., FITZPATRICK, D. & CASAGRANDE, V. A. 2005. Functional organization of visual cortex in the prosimian bush baby revealed by optical imaging of intrinsic signals. *J Neurophysiol*, 94, 2748-62.
- XU, X., COLLINS, C. E., KASKAN, P. M., KHAYTIN, I., KAAS, J. H. & CASAGRANDE, V. A. 2004b. Optical imaging of visually evoked responses in prosimian primates reveals conserved features of the middle temporal visual area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2566-71.
- XU, X., COLLINS, C. E., KHAYTIN, I., KAAS, J. H. & CASAGRANDE, V. A. 2006. Unequal representation of cardinal vs. oblique orientations in the middle temporal visual area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17490-5.

- YOKOO, T., KNIGHT, B. W. & SIROVICH, L. 2001. An optimization approach to signal extraction from noisy multivariate data. *Neuroimage*, 14, 1309-26.
- YU, H., FARLEY, B. J., JIN, D. Z. & SUR, M. 2005. The coordinated mapping of visual space and response features in visual cortex. *Neuron*, 47, 267-80.
- ZAGO, S., FERRUCCI, R., MARCEGLIA, S. & PRIORI, A. 2009. The Mosso method for recording brain pulsation: the forerunner of functional neuroimaging. *Neuroimage*, 48, 652-6.
- ZEPEDA, A., ARIAS, C. & SENGPIEL, F. 2004. Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods*, 136, 1-21.
- ZHAN, C. A. & BAKER, C. L., JR. 2008. Critical spatial frequencies for illusory contour processing in early visual cortex. *Cereb Cortex*, 18, 1029-41.

8 Annexes

Cette section présente certains des autres projets réalisés lors de cette thèse ainsi que des résultats supplémentaires associés à la discussion.

8.1 Matériels supplémentaires

(Page suivante)

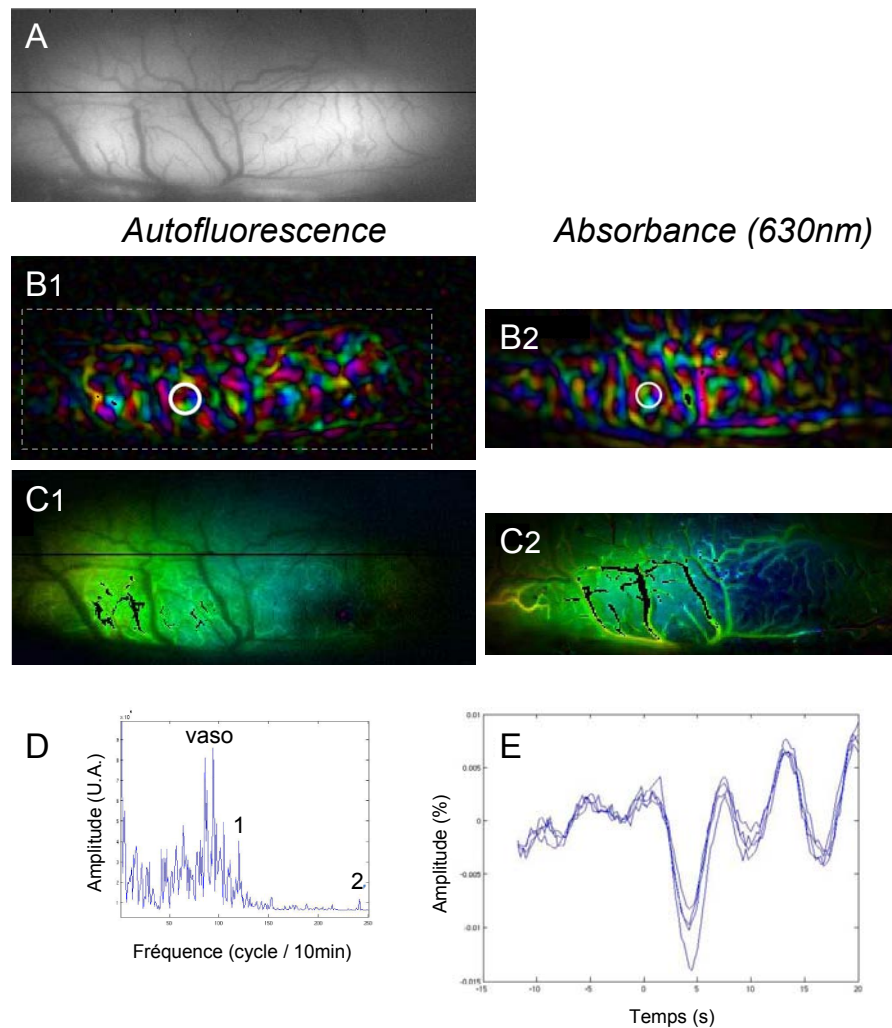


Figure 34. La mesure d'autofluorescence est majoritairement affectée par l'hémoglobine. (A) Fluorescence intrinsèque basale, excitation : 420-490 nm, émission : >515 nm. Le dispositif est similaire à celui utilisé par Husson et al., (2007). (B) Cartes d'orientation chez le chat, mesurées à l'aide du paradigme de stimulation continue à partir du signal de l'autofluorescence (B1) et de l'absorbance à 630 nm (B2). La position d'un « pinwheel » commun est indiquée par les cercles blancs ; notez le léger « shift » de ~45deg dans les phases. (C) Cartes de rétinotopie chez le chat dans l'axe de l'élévation, mesurées à l'aide du paradigme de stimulation continue à partir du signal de l'autofluorescence (C1) ou de l'absorbance à 630 nm (C2). Notez à nouveau le léger « shift » dans les phases. (D) Spectre d'amplitude du signal de l'autofluorescence dans le paradigme de stimulation continue pour cartographier la rétinotopie. Les harmoniques 1 et 2 sont indiquées sur le graphique. Notez la présence majoritaire des ondes vasomotrices (vaso) autour de 90 cycles / 10 min (~0.15 Hz). (E) Décours du signal de l'autofluorescence en réponse à la présentation d'un réseau de barre. Notez l'absence de signal positif associé aux changements d'état d'oxydation des flavoprotéines. L'absence d'une inversion des phases (B-C), de la présence des ondes de Mayer (D) et d'une augmentation de l'absorbance (E) indiquent que le signal d'autofluorescence enregistré est majoritairement affecté par les composantes hémodynamiques (e.g. volume sanguin).

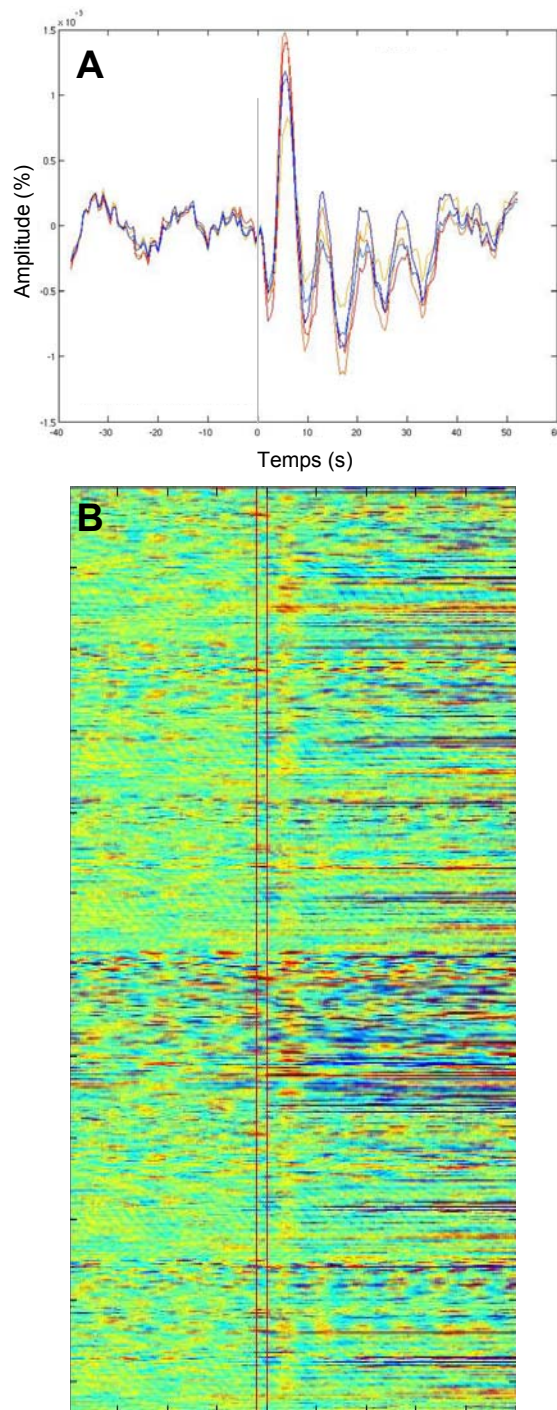


Figure 35. Les ondes de Mayer se synchronisent-elles avec la réponse hémodynamique ? (A) Réponses hémodynamiques enregistrées chez un chat anesthésié à l'halothane dans 6 positions différentes du cortex (lignes colorées). Chaque enregistrement est une somme de 200 répétitions et est séparé par un « blank » d'une durée de 90s (non présenté). Notez la présence des larges oscillations durant 40s suivant la stimulation. (B) Réponses individuelles de chacune des 200 répétitions dans les 6 positions corticales. Notez la présence des oscillations précédents la stimulation (lignes rouges), ayant tendance à se synchroniser avec la réponse hémodynamique lors de la stimulation.

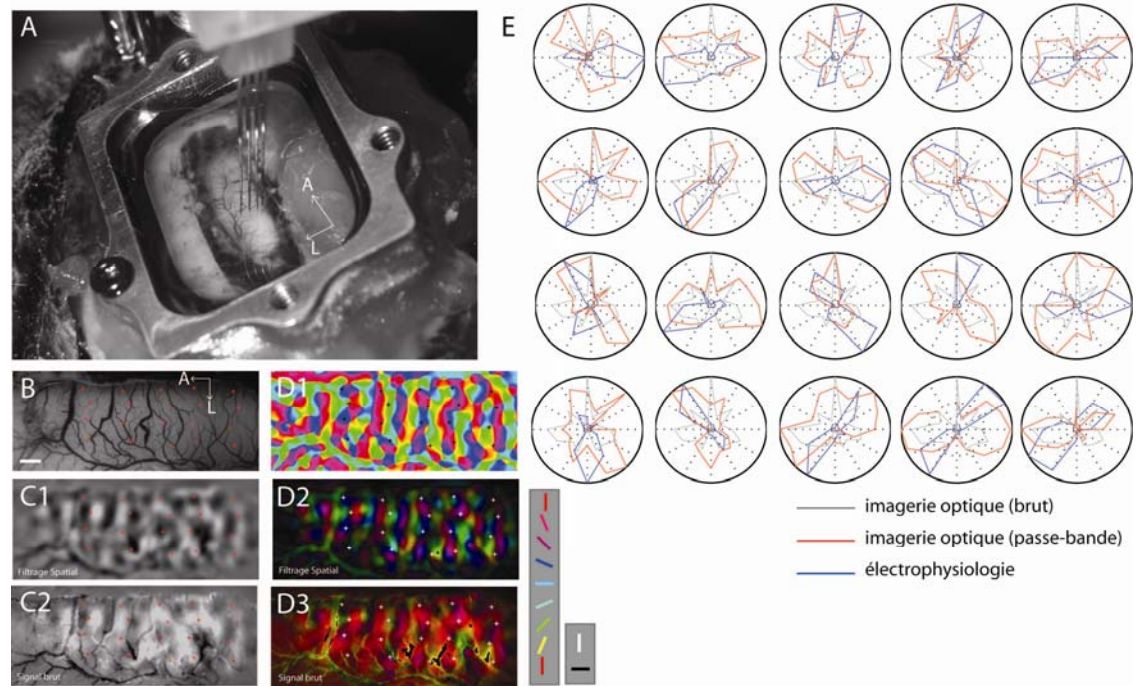


Figure 36. Filtrage spatial en imagerie optique. (A) Photographie du dispositif permettant de comparer la réponse en imagerie et en électrophysiologie (système de multi-électrodes). (B) Image anatomique du cortex. Les croix rouges indiquent les positions des enregistrements électrophysiologiques. (C) Cartes d'orientation différentielles avec (C1) et sans (C2) filtrage spatial. (D) Cartes de préférence d'orientation seules (D1) et normalisées par l'amplitude calculées après un filtrage spatiale (D2). (D3) Idem à D2 mais sans filtrage spatial. Notez la contribution du bruit spatial de basse fréquence (majoritairement blanc en C, rouge en D). (E) Comparaison des réponses obtenues en imagerie optique avec (rouge) et sans (gris) filtrage spatial au niveau des pixels où ont été effectués des enregistrements électrophysiologiques (bleu, 1 neurone par site). Il est à noter que pour rapporter adéquatement la réponse des signaux intrinsèques, le signal a été inversé (Zhan et Baker, 2008, Zhan et al., 2005). Notez le certain niveau de correspondance entre les mesures électrophysiologiques et d'imagerie réalisées avec filtrage alors que les réponses non filtrées sont majoritairement contaminées par le bruit de basse fréquence (i.e. le profil de réponse quasi identique dans chacun des sites). Les enregistrements ont été réalisés grâce à la contribution précieuse de Melissa Savard du laboratoire.

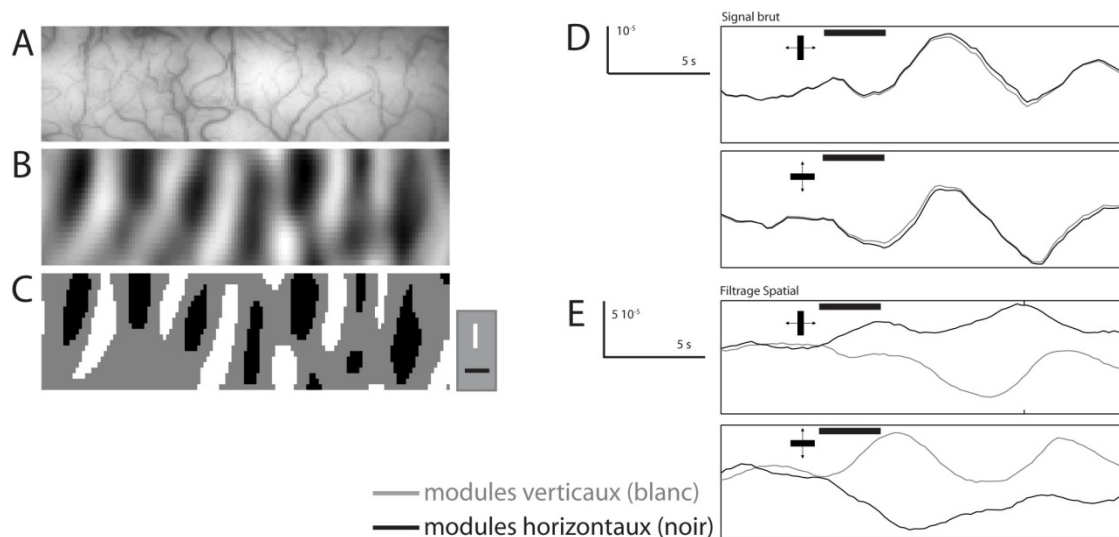


Figure 37. Filtrage spatial en imagerie optique (suite). (A) Image anatomique d'une portion du cortex. (B) Carte d'orientation différentielle réalisée après un filtrage spatial. (C) Carte d'orientation différentielle binarisée. Les domaines activés par les orientations horizontales sont indiqués en noir (et en blanc pour les orientations verticales). (D) Réponses hémodynamiques dans les domaines activés par les orientations horizontales (en noir) et verticales (en gris) suite à des stimulations verticales (haut) et horizontales (bas). (E) Idem à D mais à partir d'images filtrées. Ce filtrage spatial a pour effet de supprimer les composantes de basse fréquence spatiale et donc de retirer les réponses non spécifiques au profit des modules. Notez la diminution continue du signal dans les modules activés (augmentation de l'absorbance).

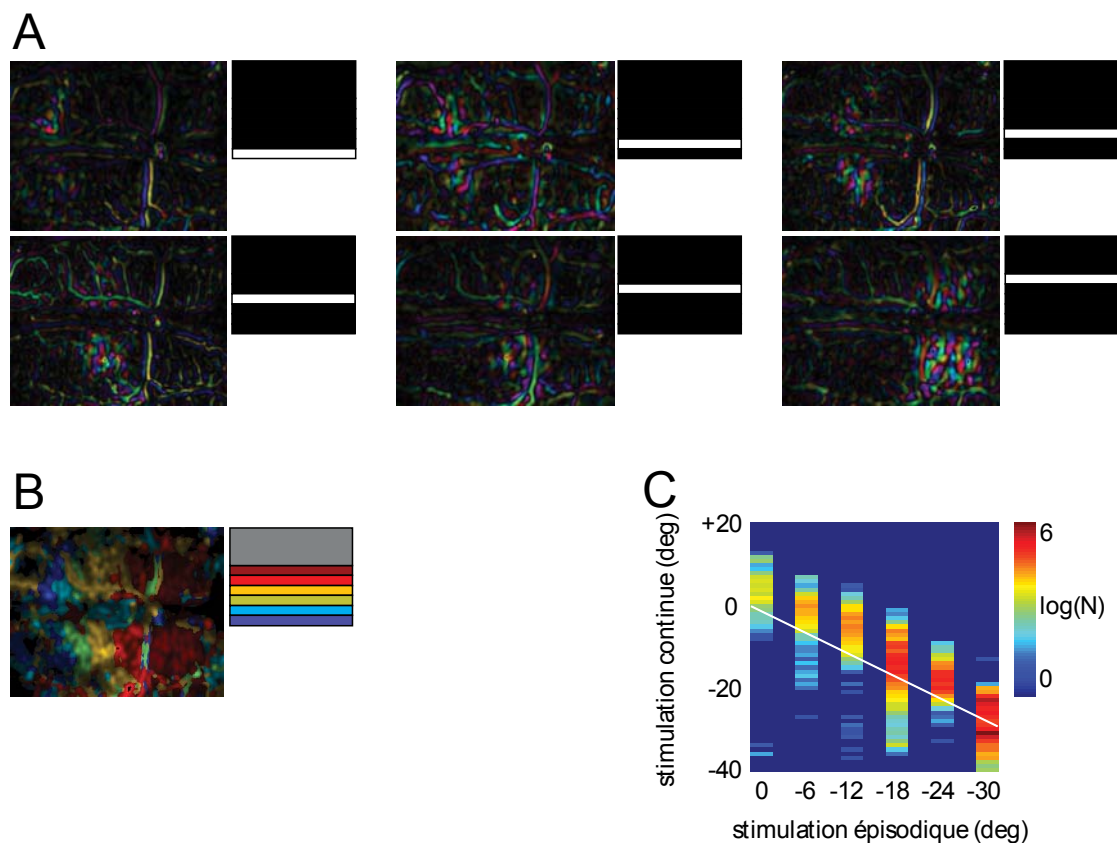


Figure 38. Validation des mesures rétinotopiques en stimulation continue. (A) Cartes d'orientations mesurées en stimulation continue dans l'aire 18 pour six positions circonscrites du champ visuel (barres de 6 degrés de hauteur à 0, -6, -12, -18, -24 et -30 degrés d'élévation). Les enregistrements ont été réalisés dans la même région d'intérêt que la rétinotopie présentée en figures 3 et figure supplémentaire 2 de l'étude 3a. (B) Carte de rétinotopie selon l'élévation obtenue avec les données en A (normalisée par l'amplitude). La couleur correspond à la position visuelle préférée (i.e. position évoquant la plus forte réponse pour chaque pixel). Le code couleur est indiqué à droite de la carte. Comparée à la stimulation continue (e.g. figures 3 de l'étude 3a), cette méthode produit des cartes de bien plus faible résolution spatiale et en beaucoup plus de temps. (C) Corrélation entre les positions rétinotopiques mesurées en B et celles en stimulation continue (figure supplémentaire 2 de l'étude 3a).

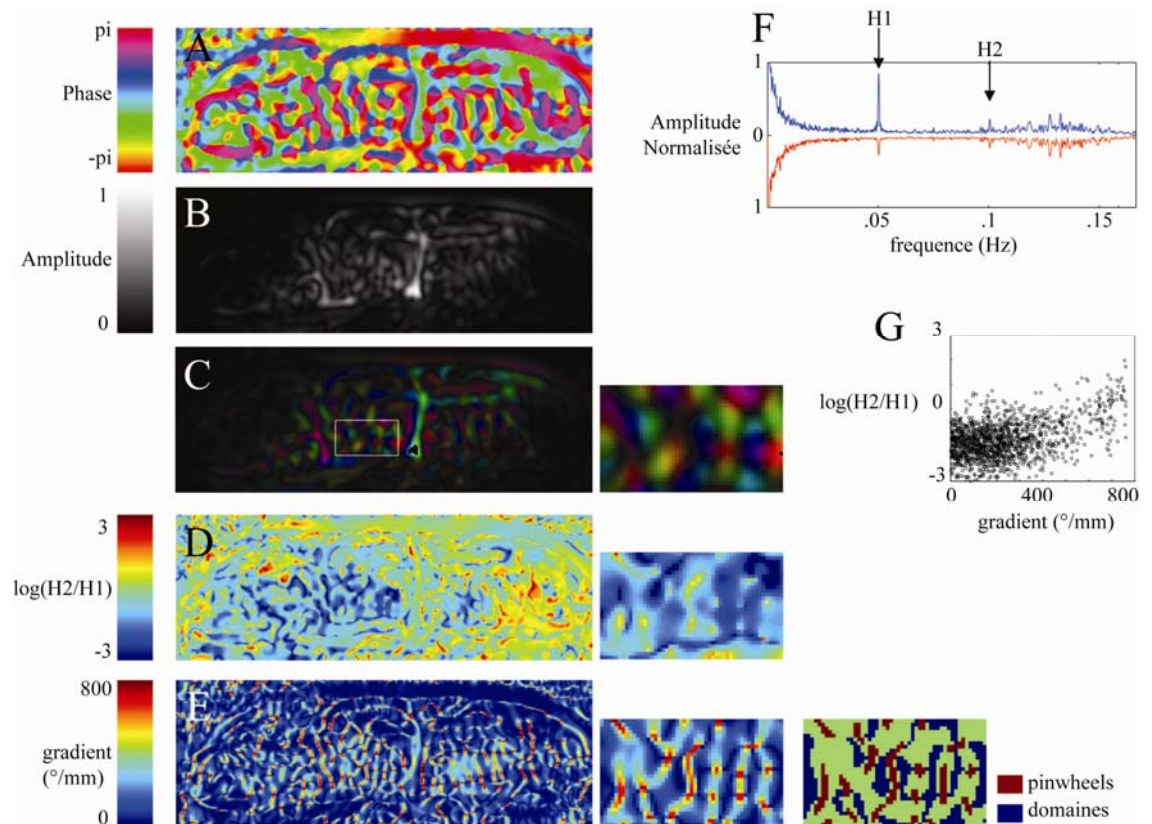


Figure 39. Mesure de la largeur de bande pour l'orientation en stimulation continue. (A-B). Cartes de préférence d'orientation (A) et d'amplitude (B) mesurées à partir du paradigme de stimulation continue à la première harmonique (*i.e.* **double de la fréquence de rotation**). Cette carte provient de l'étude 3b. (C) Carte de préférence d'orientation en (A) normalisée par l'amplitude en (B). A droite = grossissement de la zone indiquée par le carré blanc. (D) Carte du rapport de la 2^e sur la 1^e harmonique. Selon le modèle de l'étude 3a, ce rapport doit être inversement proportionnel à la largeur de bande. (E) Gradient polaire de l'orientation (voir méthode de l'article 3b pour les détails). Ce gradient a été utilisé pour identifier les zones correspondantes aux « pinwheels » et aux domaines. (F) Spectre d'amplitude dans les régions correspondantes aux « pinwheels » (en rouge) et aux domaines (en bleu). Notez l'augmentation du ratio de la 2^e sur la 1^e harmonique au niveau des pinwheels. (G) Corrélation entre le gradient et le ratio. Notez la présence d'une relation positive.

A

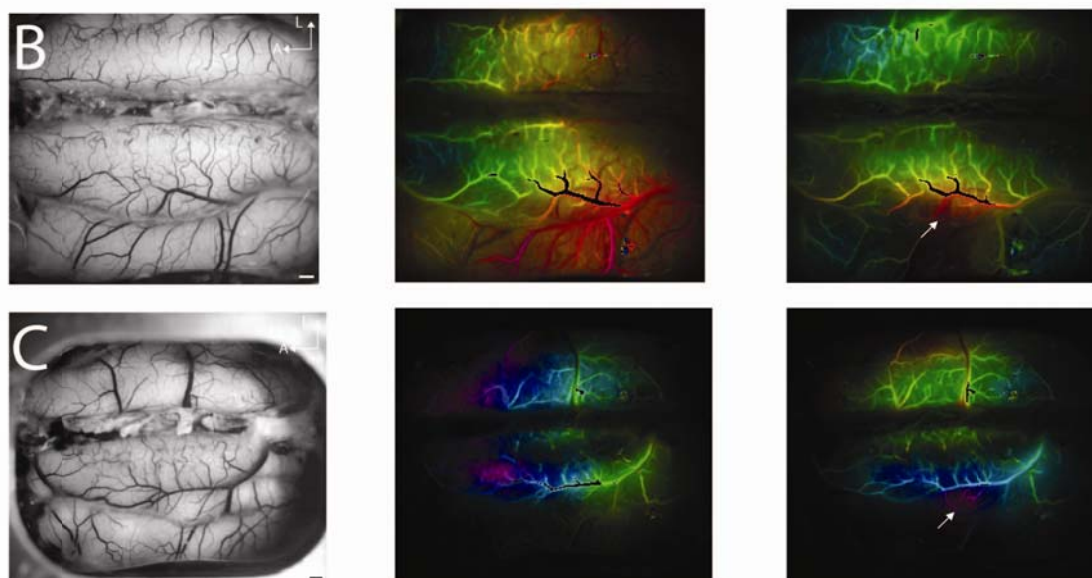


Figure 40. Potentiel de cartographie offert par une chambre d'enregistrement de 5.4 cm^2 . (A) Photographie de la chambre d'enregistrement utilisée dans toutes les études de cette thèse. (B, C) Cartes anatomiques (à gauche) et rétinotopiques dans l'axe de l'élévation (au centre) et de l'azimut (à droite) obtenue dans le cortex visuel de 2 sujets additionnels par rapport à l'étude 3a (Flèches blanche : se référer aux résultats et à la légende de la figure 3 de l'article 3a). Notez que l'activation est essentiellement dans le cortex visuel primaire. Aucune réponse n'a pu être révélée au niveau de l'aire 7 et 21a (latérales au cortex visuel primaire). La conception de cette chambre a été réalisée par Martin Villeneuve du laboratoire et François Vaillancourt de l'école d'optométrie.

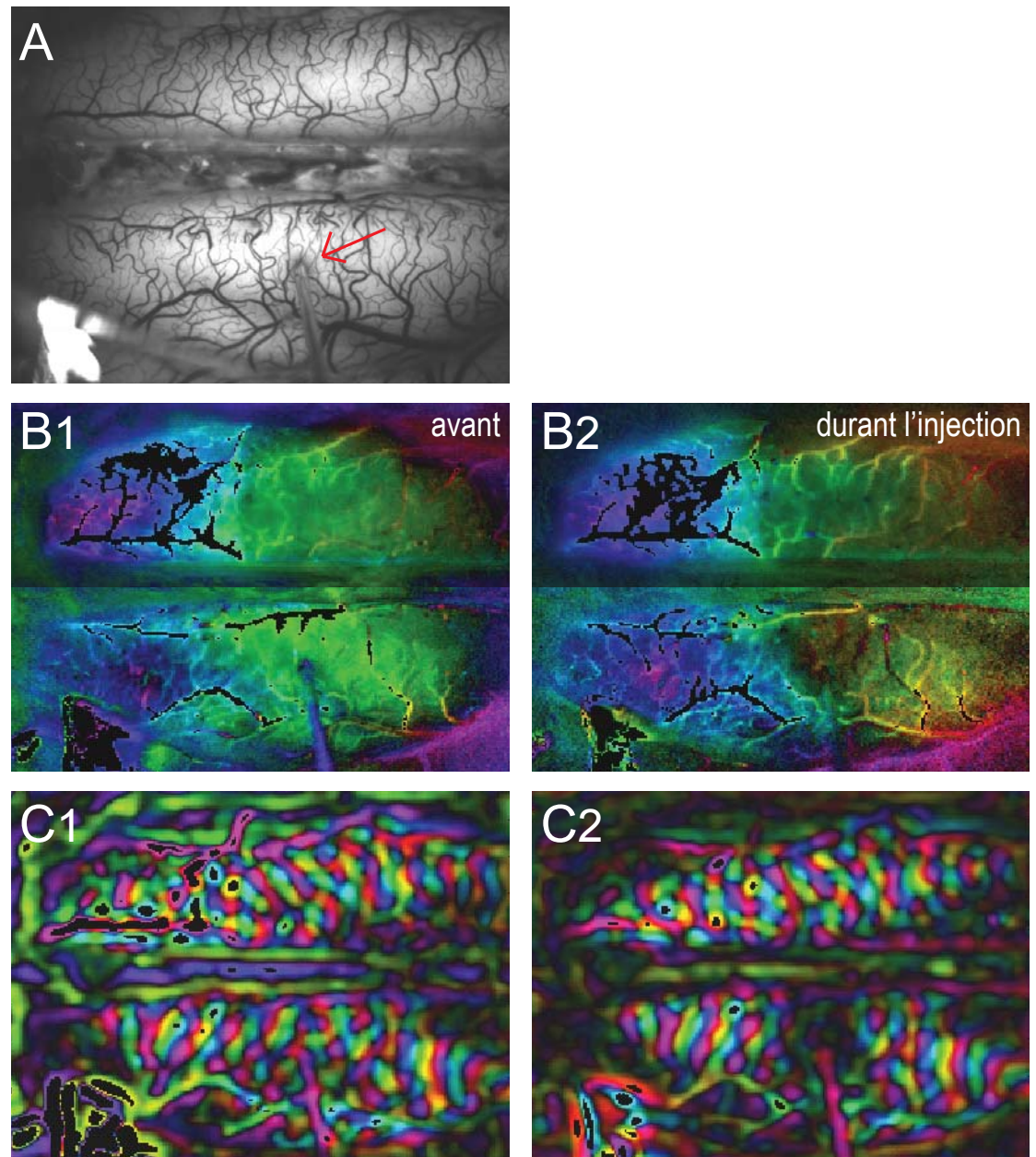


Figure 41. Mesure de l'inactivation réversible en imagerie optique. (A) Image anatomique du cortex visuel du chat dans lequel un dispositif d'injection a été placé (flèche rouge). La chambre a alors été remplie d'agarose (1%) et recouverte par une vitre. (B) Réponses rétino-topique en stimulation continue avant (B1) et pendant (B2) l'injection de xylocaïne (2%). (C) Cartes d'orientation en stimulation continue avant (C1) et pendant (C2) l'injection. Chaque enregistrement en B et C a duré 10 min. Notez la présence d'une zone d'inactivation autour du site d'injection.

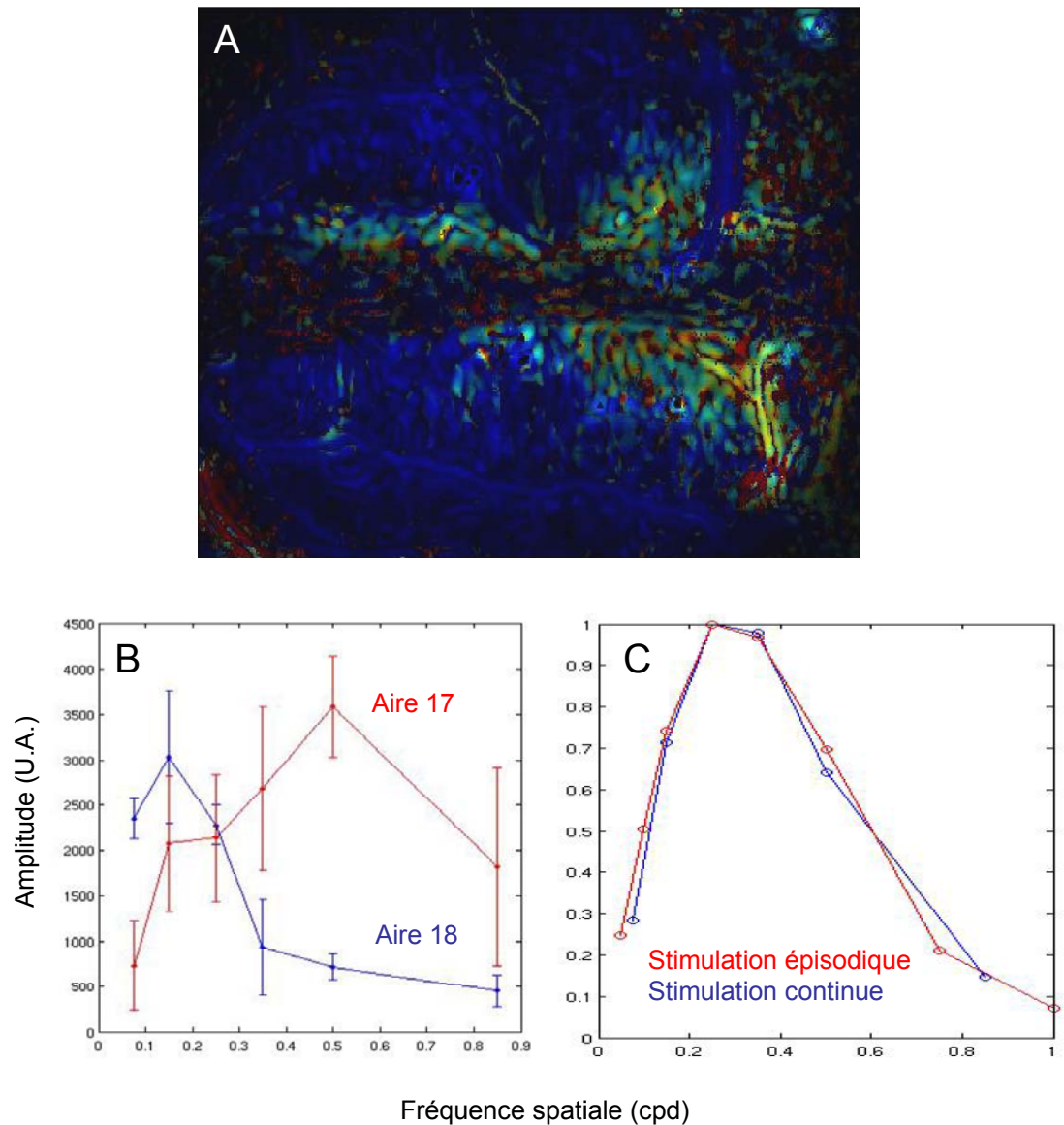


Figure 42. Mesure de la fréquence spatiale à l'aide de la stimulation continue. (A) Fréquence spatiale optimale (couleur) normalisée par l'amplitude (luminance) dans le cortex visuel primaire du chat. Le calcul a été effectué en modélisant la réponse à l'amplitude par une fonction de réponse pour la fréquence spatiale telle que décrite dans les articles 2 et 3a. Chaque amplitude a été obtenue à partir du paradigme de stimulation continue. Cette technique permet donc d'obtenir des cartes de fréquence spatiale en beaucoup moins de temps qu'en réalisant des cartes d'orientation en stimulation épisodique. Notez la fréquence spatiale plus basse dans l'aire 18 (bleu) que dans l'aire 17 (vert-rouge). Notez la présence de domaines de forte (rouge) et faible (vert/turquoise) fréquences spatiales dans l'aire 17. (B) Mesures de la courbe de fréquence spatiale dans deux sites au niveau de l'aire 17 (rouge) et de l'aire 18 (bleu). (C) Mesures de la fréquence spatiale à partir des mesures d'amplitude provenant du paradigme de stimulation continue (bleu) ou épisodique (rouge) dans un même pixel.

8.2 Organisation fonctionnelle du cortex visuel du toupaye

Cette étude préliminaire a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Martin Villeneuve, Karine Minville et Geneviève Cyr du laboratoire et Heywood Petry et Marta Bickford de l'université de Louisville.

8.2.1 Mise en contexte

Le toupaye (*tupaia belangeri*, « tree shrew ») est un des cousins les plus proches des primates et est considéré comme un excellent modèle pour étudier la relation structure / fonction dans le système visuel. Un des intérêts majeur de ce modèle animal est la présence d'un cortex lisse, sans circonvolution. Ainsi, l'imagerie optique peut avoir accès à un grand nombre d'aires corticales contrairement au chat chez qui certaines aires, telles que le PMLS, se trouvent intégrées dans un sulcus. L'imagerie optique a d'ailleurs permis de révéler une organisation fonctionnelle en colonnes d'orientation dans l'aire V1 similairement à celle observée chez les primates (Bosking et al., 2002, Bosking et al., 2000, Bosking et al., 1997). Toutefois, jusqu'à maintenant aucune étude n'a montré d'organisation fonctionnelle au delà de l'aire V1. De plus la sélectivité à la fréquence spatiale et son organisation, ainsi que celle pour la direction n'ont encore jamais été étudiée.

Le but de cette étude a été de caractériser plus en détail l'organisation de l'aire V1 et des structures adjacentes telles que l'aire V2 à l'aide de l'imagerie optique des signaux intrinsèques. Les animaux (n = 14) ont été anesthésiés à l'halothane ou à la kétamine. Le cortex visuel primaire a été rendu accessible par une craniotomie et les cartes fonctionnelles ont été enregistrées à 630 ou 700 nm.

8.2.2 Évaluation de la fréquence spatiale

En utilisant le paradigme de stimulation continue, des cartes d'orientations modulaires ont été révélées dans le cortex visuel en réponse à des réseaux de barres (figure 43A-B). L'amplitude de la réponse à l'orientation a alors été mesurée en fonction de la fréquence spatiale (figure 43C). Pour chaque pixel, la réponse à la fréquence spatiale a été modélisée par une courbe pour estimer la fréquence spatiale optimale évoquant la réponse la plus forte (SF_o, figure 43D). Cette procédure était

similaire à celle utilisée pour mesurer la SFo dans les études et 3a ainsi que la figure 42 de l'annexe. La SFo a été évaluée en chaque point permettant d'établir une carte qui semblait être organisée en domaines de haute et de basse fréquences spatiales et dont la moyenne des valeurs se trouvait autour de 0.1 cpd (figure 43E-F).

Une organisation modulaire pour la fréquence spatiale semblerait donc exister dans le cortex visuel du toupaye de manière similaire aux primates et aux carnivores. Dans l'avenir, l'analyse de la légitimité de cette organisation sera confirmée en employant des méthodes telles que celle utilisée dans l'étude 1 (i.e. comparaison des cartes obtenues chacune à partir de la moitié des données). De plus les cartes de SFo seront comparées à celle pour l'orientation afin d'étudier leurs interactions et confirmer la théorie d'uniformité de recouvrement sur cette espèce.

8.2.3 Absence de carte d'orientation dans l'aire V2

La figure 44 (A-B) présente un deuxième exemple d'organisation modulaire pour l'orientation chez un autre sujet. La coloration de Nissl (Bosking et al., 2000, Bosking et al., 1997) a permis de délimiter l'aire V1 (figure 44C). Les frontières de l'aire V1 ont pu également être délimitées fonctionnellement par l'établissement de la carte rétinotopique obtenue à l'aide du paradigme de stimulation continue (Kalatsky et Stryker, 2003). En général, l'activation visuelle évoquée par une barre horizontale était plus étendue que celle obtenues avec les cartes d'orientation (2-3mm plus large, latéralement à l'aire V1, figure 44D). Cette zone corticale étendue montrait une représentation en miroir de la rétinotopie selon l'azimut par rapport à l'aire V1 (figure 44E).

L'organisation de cette seconde représentation rétinotopique par rapport à l'aire V1 semble donc être similaire à l'organisation entre les aires 17 et 18 chez le chat (Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979). Ainsi, cette zone corticale étendue pourrait correspondre à l'aire V2, en conformité avec la localisation anatomique établie par d'autres études (Kaas et al., 1972). Aucune organisation pour l'orientation ne semblerait donc exister dans l'aire V2 du toupaye contrairement aux primates et ce, malgré la large gamme de fréquences spatiales présentées (figure 43). Ces résultats sont donc en accord avec ceux de (Bosking et al., 1997) qui n'ont pas non plus révélé

d'organisation pour l'orientation hors des zones marquées par la coloration de Nills. Il est à noter qu'étant donné que les modules d'orientation ne semblent présents que dans l'aire V1, les fréquences spatiales mesurées préalablement à partir des modules d'orientation, correspondent donc spécifiquement à celle des neurones de l'aire V1.

8.2.4 Absence de carte de direction dans l'aire V1

Alors qu'une organisation spatiale claire pour l'orientation peut être révélée dans l'aire V1, aucune évidence de modules de direction n'a pu être apportée jusqu'à maintenant et ce, aussi bien en employant des réseaux de barres que des points en mouvement (figure 44F). A titre de comparaison, dans chaque domaine d'orientation chez le chat, il est possible d'observer des sous-domaines de directions opposées et orthogonales à l'orientation (figure 44G, voir également (Shmuel et Grinvald, 1996)). Il est à noter que la mesure de la direction par la stimulation continue telle qu'utilisée dans l'étude 3b, a fourni des résultats contradictoires avec ceux présentés précédemment (résultats non montrés). Une faible réponse, spécifique au stimulus, a parfois pu être quantifiée à la première harmonique signifiant une réponse à la direction. Toutefois, cette faible réponse n'était associée qu'à deux uniques valeurs de phases (deux directions opposées) et non une couverture complète de la gamme de direction. Ces résultats quant à la présence ou l'absence de direction nécessiteront donc dans l'avenir des expériences supplémentaires.

Cette absence ou faible détection de carte de direction dans l'aire V1 (et d'orientation dans l'aire V2) pourrait être la conséquence également d'un trop faible niveau de rapport signal / bruit. De plus, il semblerait que les neurones des couches supérieures du cortex, enregistrées en imagerie optique, soit généralement peu sélectifs à la direction chez le toupaye (Van Hooser, 2007). Si la sélectivité à la direction se retrouve dans les couches inférieures du cortex, l'emploi de l'imagerie laminaire pourrait permettre d'évaluer si une organisation pour la direction existe au sein des couches V et VI du cortex (Belanger et al., 2010, Hillman et al., 2007).

Même si une organisation pour la direction existe dans l'aire V1 du toupaye, il semble quoiqu'il en soit qu'elle soit très faible en comparaison à celle des carnivores. Ceci est cohérent avec l'absence de domaines de direction dans l'aire V1 des primates

avec lesquels les toupayes sont proches génétiquement. Dans le futur, nous chercherons à établir si l'homologue de l'aire MT chez le toupaye (i.e. l'aire TD), possède des domaines de direction similairement à ceux révélés dans l'aire MT des primates (voir chapitre 2.1.3).

En conclusion, certaines similarités fonctionnelles existent dans l'organisation de l'aire V1 entre les toupayes et les primates (présence de domaines d'orientation et de fréquence spatiale, absence de domaine de direction). Néanmoins, contrairement au primate, aucune organisation pour l'orientation n'a pu pour l'instant être révélée dans l'aire V2.

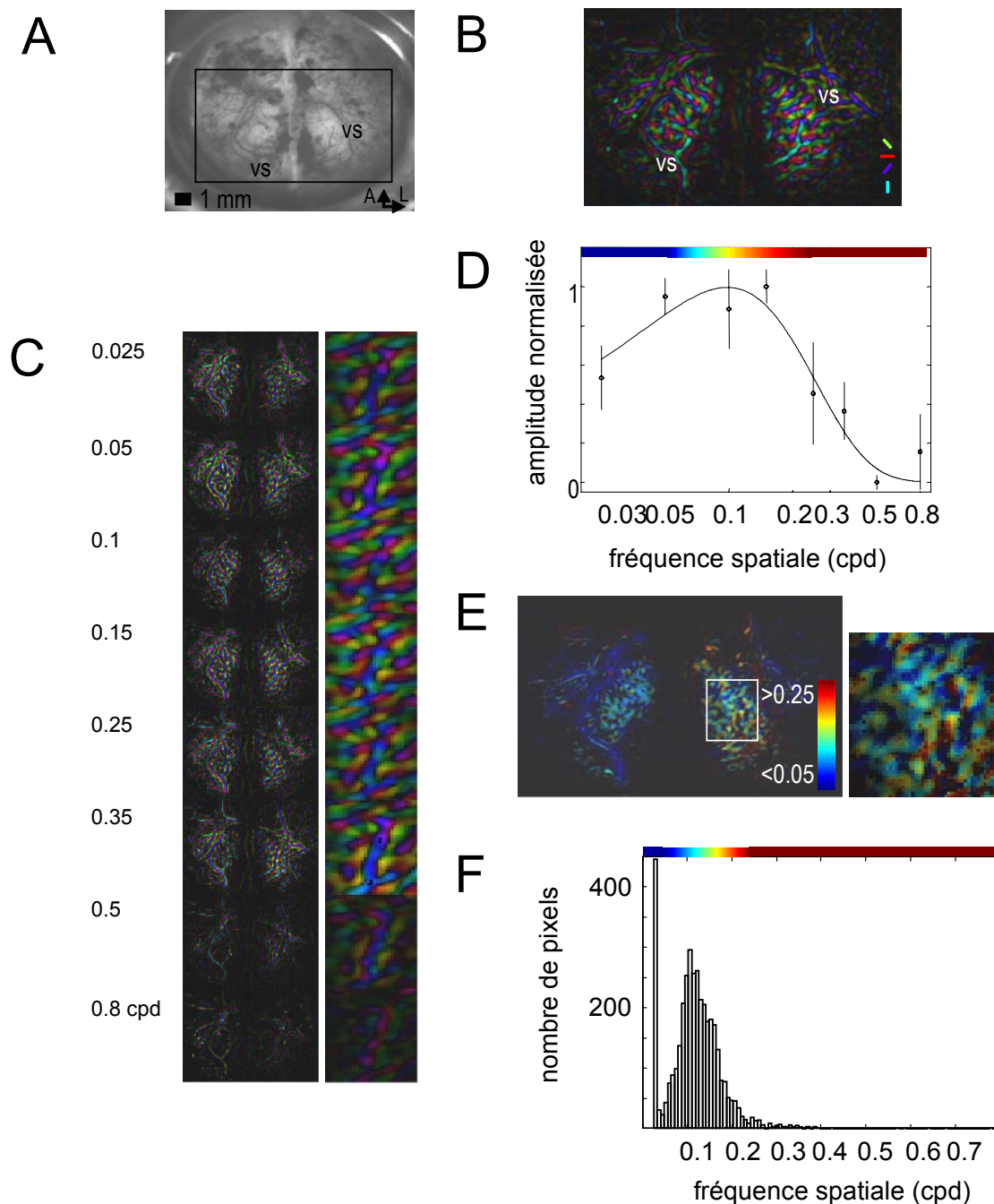


Figure 43. Fréquence spatiale dans le cortex visuel du toupaye. (A-B) Carte anatomique du cortex et carte de sélectivité à l'orientation obtenue par la multiplication de la carte d'orientation préférée (couleur) et de la carte d'amplitude (niveaux de luminance). (vs) vaisseaux sanguins. (C) Cartes de sélectivité à l'orientation mesurées à 8 fréquences spatiales (colonne de droite = grossissement). (D) Moyenne (+SD, 4 répétitions) de l'amplitude de la réponse à l'orientation mesurée dans un pixel et modélisée par une fonction de fréquence spatiale (ligne). (E) Carte de la fréquence spatiale optimale (couleur) multipliée par l'amplitude du signal (niveau de luminance). (F) Distribution de la fréquence spatiale optimale dans la région d'intérêt délimitée par le carré blanc en E.

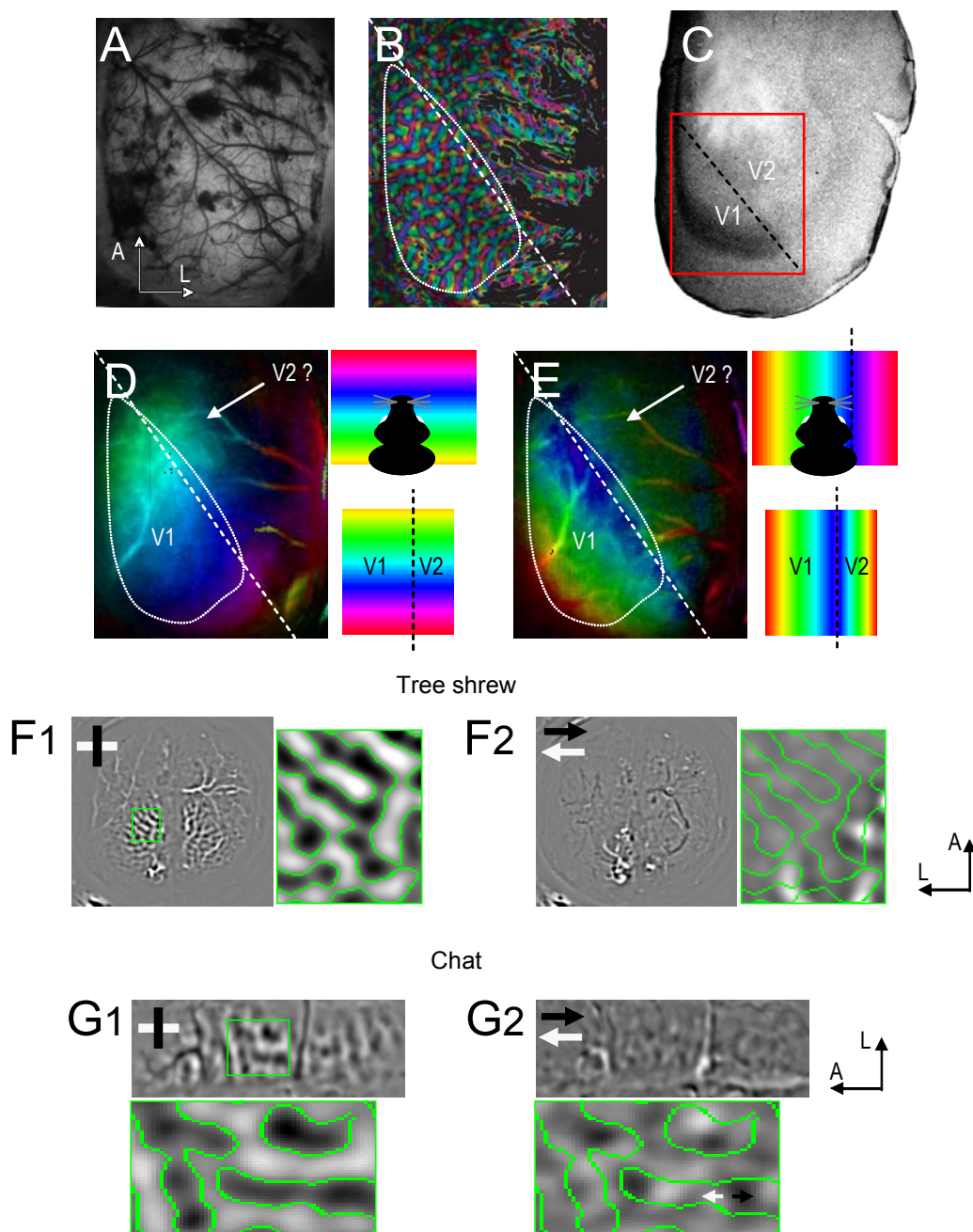


Figure 44. Orientation et direction dans le cortex visuel du toupaye. (A-B) Carte anatomique du cortex et carte de sélectivité à l'orientation obtenue à partir d'un autre sujet. La ligne pointillée blanche délimite la zone où les domaines d'orientation sont présent (C) Coupe tangentielle du cortex montrant la coloration de Nissl. (D-E) Rétinotopie dans l'axe de l'élévation et de l'azimut. A droite : schématisation de l'arrangement rétinotopique qui pourrait exister entre l'aire V1 et V2. (F) Cartes différentielles pour les orientations cardinales et les directions nasotemporales mesurées dans l'aire V1 du toupaye (colonne de droite = grossissement montrant en vert, les limites entre les modules d'orientation). (G) Cartes différentielles pour l'orientation et la direction mesurées dans l'aire 18 du chat (données provenant de l'étude 3b).

8.3 Organisation fonctionnelle du cortex visuel chez le lapin

Cette étude préliminaire a permis d'établir un protocole d'imagerie optique sur le lapin, offrant entre autre une surface de cortex plus grande que celles des autres « glires » utilisés en laboratoire (e.g. rongeurs). Malgré le fait que l'organisation rétinotopique ait déjà été caractérisée par électrophysiologie (Thompson et al., 1950) et qu'aucune évidence d'organisation modulaire pour l'orientation ne soit rapportée (Murphy et Berman, 1979), jamais aucune étude en imagerie cérébrale fonctionnelle *in vivo* n'a encore été réalisée sur ce modèle (i.e. cortex visuel du lapin).

L'objectif de cette étude était donc de cartographier par imagerie optique la rétinotopie et la réponse à l'orientation dans le cortex visuel du lapin. Trois lapins pigmentés ont été utilisés et le protocole expérimental était similaire à celui du chat dans les études de cette thèse (anesthésie à l'halothane, ventilation artificielle, imagerie à 630 nm, ...)

La figure 45 présente l'organisation rétinotopique dans l'axe de l'azimut (B) et de l'élévation (C) pour un stimulus présenté exclusivement dans la partie contra-latérale droite. La rétinotopie selon l'élévation a également été mesuré lorsque l'écran était disposé en face de l'animal (D). Le gradient pour l'élévation était représenté dans l'axe lateral-postérieur vers medial-antérieur et celui pour l'azimut, dans un axe orthogonal, en accord avec (Thompson et al., 1950). La mise en évidence d'une zone binoculaire n'a par contre jamais été possible aussi bien avec la méthode développée dans l'article 3b que celle dans l'annexe 8.4.

En employant des réseaux de barres en mouvement, les cartes différentielles n'ont jamais permis de révéler la moindre organisation modulaire pour l'orientation ou la direction en accord avec (Murphy et Berman, 1979) (résultats non montrés). Par contre, l'utilisation de la stimulation continue telle qu'utilisée dans l'étude 3b, a fourni des résultats contradictoires avec les précédents. En effet, une faible réponse, spécifique au stimulus, a pu être mesurée à la 1ère, 2ème et 4ème harmonique (E). Toutefois, ces réponses ne s'associaient pas à une organisation en domaine fiable (résultats non montrés). L'hypothèse d'une modulation temporelle provoquée par une surreprésentation de certaines directions et orientations dans l'ensemble du cortex, tels que décrit par (Murphy et Berman, 1979) pourrait expliquer ce phénomène.

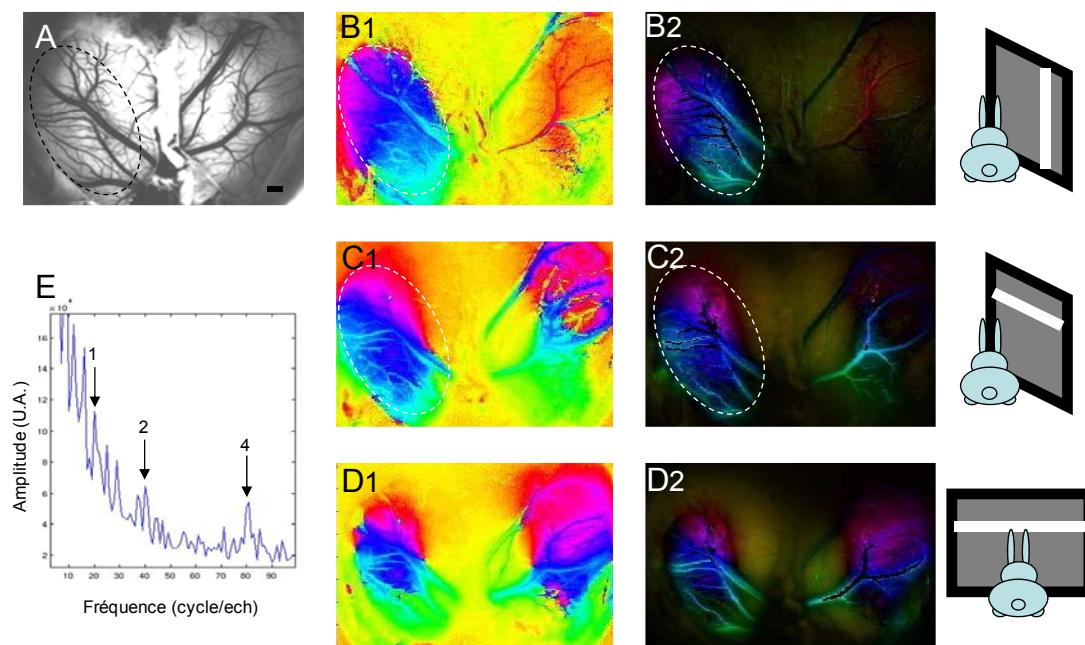


Figure 45. Organisation fonctionnelle du cortex visuel du lapin. (A) Carte anatomique du cortex (ligne pointillée noire = délimitation du cortex visuel). Barre = 1mm. (B) Carte rétinotopique dans l'axe de l'azimut. Phase (B1) et de phase normalisée par l'amplitude (B2) à la fréquence de stimulation (barre verticale en déplacement, à 45° à droite de l'axe de l'animal). (C) Carte rétinotopique dans l'axe de l'élévation en réponse à une barre horizontale. (D) Carte rétinotopique dans l'axe de l'élévation en réponse à une barre horizontale en déplacement face à l'animal. (E) Spectre d'amplitude en réponse à un réseau de barre en mouvement dont la direction changeait de manière périodique similairement à l'étude 3b (fréquence de stimulation = 20 rotations en 15 min). « 1 », « 2 » et « 4 » indiquent la position de la 1^{ère}, 2^{nde} et 4^{ème} harmoniques.

8.4 Impact des récepteurs CB1 aux endocannabinoïdes sur l'organisation fonctionnelle du cortex visuel de la souris et le couplage hémodynamique

Cette étude préliminaire a été réalisée dans le cadre du stage de maîtrise de Céline Robert, en collaboration avec Karine Minville et Jean-François Bouchard (du laboratoire de neuropharmacologie de l'école d'optométrie). Cette étude a été initiée sur une souche de souris KO pour les récepteurs CB1 durant l'année 2009. Elle se poursuit maintenant sur 2 souches de souris KO pour les chacun des récepteurs CB1 et CB2 avec l'aide d'un autre candidat à la maîtrise.

8.4.1 Mise en contexte

Les endocannabinoïdes sont des molécules participant à nombreuses fonctions cérébrales et dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés. Ils agissent sur deux principaux types de récepteurs transmembranaires couplés aux protéines Gi, les CB1 et les CB2 (Wilson et Nicoll, 2002). Les récepteurs CB1 sont pour l'instant les mieux caractérisés et présent dans de nombreuses structures visuelles telles que la rétine, le CGL, le collicule supérieur et le cortex (Moldrich et Wenger, 2000).

Les connexions entre ces différentes structures s'établissent durant le développement où les axones se projettent vers leurs cibles, guidés par des molécules attractives et répulsives. Plusieurs études réalisées en imagerie optique chez la souris ont montré que les éphrines jouaient un rôle majeur dans l'établissement des connexions entre les cellules de la rétine, le collicule supérieur, le CGL et le cortex visuel (Cang et al., 2005b, Cang et al., 2008a, Cang et al., 2008b). Les endocannabinoïdes sont également connu pour avoir un rôle dans le développement du cerveau (Harkany et al., 2007). Récemment, (Argaw et al., 2008, Argaw et al., 2009) ont d'ailleurs montré que les endocannabinoïdes semblaient impliqués dans ces mécanismes de « câblage » du système visuel par le biais des récepteurs CB1.

L'objectif de l'étude était donc de comprendre le rôle des récepteurs CB1 dans l'établissement de l'organisation fonctionnelle du cortex visuel primaire. L'organisation rétinotopique, la sensibilité au contraste et la sélectivité à la fréquence spatiale ont donc été évaluées à l'aide de l'imagerie optique des signaux intrinsèques et comparées entre des souris *cnr1^{-/-}* (KO, sans récepteur CB1, n = 7) et sauvages

(WT, n = 8). L'impact de CB1 sur le couplage neurovasculaire a également été évalué. Les souris ont été anesthésiées à l'uréthane et l'accès au cortex a été rendu possible sans effectuer de craniotomie du fait de la transparence de l'os du crane (Kalatsky et Stryker, 2003). Les enregistrements ont été effectués à une longueur d'onde de 630 nm sur les deux aires V1 conjointement.

8.4.2 Couplage neurovasculaire

La réponse hémodynamique suite à la présentation d'une stimulation de 2s a été évaluée pour 5 contrastes différents (figure 46A, réseaux de barres de 6, 12, 25, 50 et 100 %). Le profil de la réponse observé chez les souris WT était une phase négative atteinte 2s après le début de la présentation du stimulus, suivie d'une phase positive, plus faible en amplitude et atteinte 6s après le stimulus.

Aux contrastes les plus forts (25, 50 et 100 %), le profil de cette réponse hémodynamique était très différent entre les souris KO et WT. En l'absence de CB1, la phase positive de la réponse hémodynamique était en effet grandement réduite par rapport à la phase négative (figure 46B, $p = 0.035$).

Ces résultats suggéreraient donc un rôle possible des récepteurs CB1 dans le couplage hémodynamique. Des études ont d'ailleurs montré que ces récepteurs pouvaient avoir un effet sur la vasodilatation des capillaires (voir pour revue (Hillard, 2000)). Toutefois, à ce stade, un effet sur l'activation neuronale ne pas non plus être exclu.

Dans le futur, l'étude de l'origine neuronale ou vasculaire de cet effet pourrait être envisagée. L'approche développée par (Dunn et al., 2005), représenterait une voie très pertinente dans cet objectif. En effet, en mesurant l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde et les images du « speckle » laser, ceux-ci ont pu évaluer conjointement la concentration en HbO₂, Hb ainsi que le flux sanguin. De plus, connaissant ces composantes, ils ont pu calculer la consommation neuronale locale en O₂ (CMRO₂), mesure très spécifique de l'activation neuronale.

L'étude des différentes composantes vasculaires et neuronales pourra également être investiguée à l'aide d'agents pharmacologiques. La compréhension de l'impact des endocannabinoïdes sur le couplage hémodynamique pourrait avoir des répercussions importantes sur les études futures et passées telles que celles employant l'IRMf.

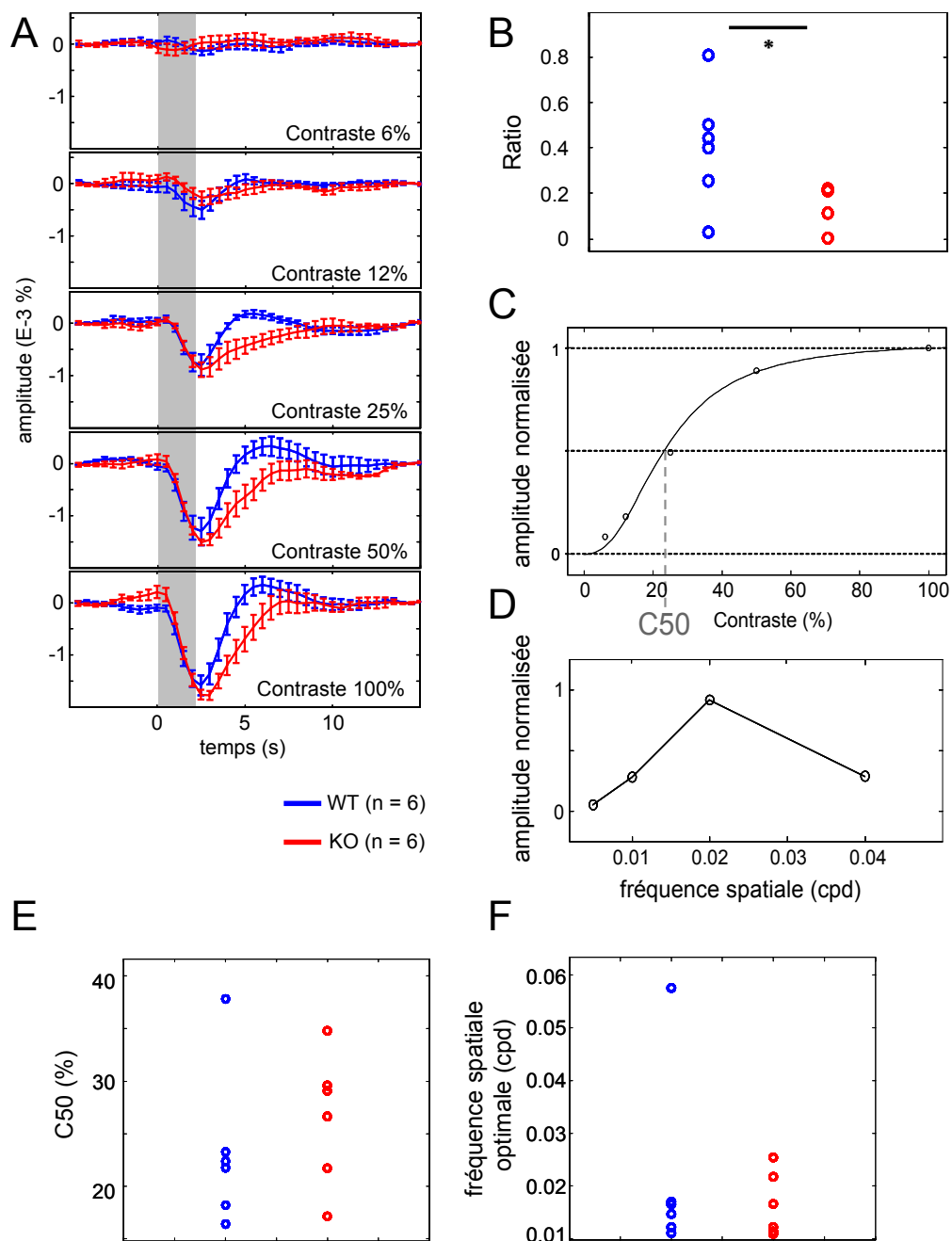


Figure 46. Influence de CB1 sur le couplage neurovasculaire, la fréquence spatiale et le contraste

(A) Moyenne (+SD) des réponses hémodynamiques obtenues chez les souris sauvages (bleu, n = 6) et KO (rouge, n = 6) pour 5 niveaux de contraste. (B) Rapport entre l'amplitude de la phase négative et positive pour chaque souris sauvage (bleu) et KO (rouge). (C) Amplitude de la phase négative en fonction du contraste dans un pixel (point), modélisée par une courbe sigmoïde (ligne) permettant d'estimer le C₅₀. (D) Amplitude de la phase négative en fonction de la fréquence spatiale dans un pixel. (E-F) C₅₀ et fréquence spatiale optimale pour chaque souris sauvage (bleu) et KO (rouge).

8.4.3 Sensibilité au contraste et sélectivité à la fréquence spatiale

Malgré le fait que l'origine neuronale ou vasculaire des variations de réponse hémodynamique n'a pas encore été identifiée, nous avons supposé à ce stade que la linéarité du couplage était conservée. Ainsi, nous avons mesuré la réponse au contraste et à la fréquence spatiale à partir de l'amplitude des réponses (phase négative).

La réponse augmentait en fonction du contraste et son profil a été modélisé par une fonction sigmoïde pour évaluer le C_{50} , le contraste évoquant 50% de la réponse maximum (figure 46C, (Carandini et Sengpiel, 2004)). La sensibilité au contraste (C_{50}), n'a pour l'instant pas montré de différence entre les souris WT et KO (figure 46E, $p = 0.447$). Dans l'avenir, l'évaluation du C_{50} à partir de la mesure de $CMRO_2$ pourrait s'avérer plus pertinente.

La réponse a également été mesurée en fonction de la fréquence spatiale (figure 46D). Aucune différence n'a pu être constatée dans la moyenne des fréquences spatiales optimales mesurée dans le cortex visuel des souris WT et KO (figure 46F, $p = 0.423$). Il semble donc que, malgré le rôle que joue CB1 dans la synaptogénèse et le guidage axonal, son absence n'a visiblement pas eu d'impact sur la fréquence spatiale et le contraste dans le cortex visuel primaire de la souris. Hors, ces paramètres dépendent fortement du bon établissement des connexions entre les structures visuelles. Des mécanismes de compensation ont donc pu se produire impliquant par exemple le récepteur CB2. Dans l'avenir, l'utilisation de KO ne possédant ni récepteur CB1, ni CB2 pourrait donc être envisagée.

8.4.4 Organisation rétinotopique

Malgré l'effet constaté de CB1 sur le couplage neurovasculaire, les cartes de rétinotopie ont été réalisées en employant le paradigme de stimulation continue. Étant donné le profil différent des réponses hémodynamiques entre souris WT et KO, il est très probable que le délai hémodynamique introduit dans les cartes soit différent. Toutefois, celui-ci peut-être facilement retiré (Kalatsky et Stryker, 2003) et son impact n'a à priori aucune influence lors de mesures relatives comme celles qui ont été réalisées dans cette étude.

Les cartes rétinotopiques ont été réalisées dans l'axe de l'azimut et de l'élévation (figure 47A-C). Malgré une différence de réponse hémodynamique, la comparaison de l'amplitude n'a montré aucune différence entre les deux groupes (figure 47D, $p = 0.5$ pour l'azimut et 0.821 pour l'élévation). En ce qui concerne la phase, aucune modification n'a jamais été observée dans l'axe de l'élévation entre les souris WT et KO. Par contre dans l'axe de l'azimut, l'absence de CB1 a produit certains changements.

En effet, les aires V1, généralement « ovales » chez les WT, avaient tendance à adopter une forme plus arrondie chez les KO (figure 47F, $p = 0.021$). De plus, le champ visuel dans l'azimut, obtenu en évaluant l'étendue de la gamme de phases présentes dans l'aire V1, était plus restreint chez les souris KO (figure 48A, $p = 0.046$). Toutefois, ces changements ne se sont pas accompagnés de modification de la surface corticale activée (figure 47E, $p = 0.517$) et de la proportion de zone binoculaire, mesurée en évaluant la proportion de « phase » commune dans les deux aires V1 (figure 48C, $p = 0.960$).

La technique retenue pour identifier la zone binoculaire a donc été l'identification de zones du cortex associées à des portions communes du champ visuel (i.e. face à l'animal). L'emploi d'autres stratégies telles que celle développée par (Cang et al., 2005a) ou présentée dans l'étude 3b n'ont pour l'instant pas permis d'obtenir des résultats reproductibles et n'ont donc pas été exploitées.

Pour finir, malgré l'effet que CB1 semble avoir sur l'établissement des connexions (Argaw et al., 2008, Argaw et al., 2009), aucun impact n'a pu être observé dans l'indice de dispersion (« scatter »), permettant d'évaluer la finesse des connexions neuronales (figure 48B, $p = 0.297$). Ces résultats sont inattendus dans la mesure où l'absence d'autres molécules de guidage, telles que les éphrines, ont par contre eu une répercussion importante sur cette mesure (Cang et al., 2005b, Cang et al., 2008a, Cang et al., 2008b).

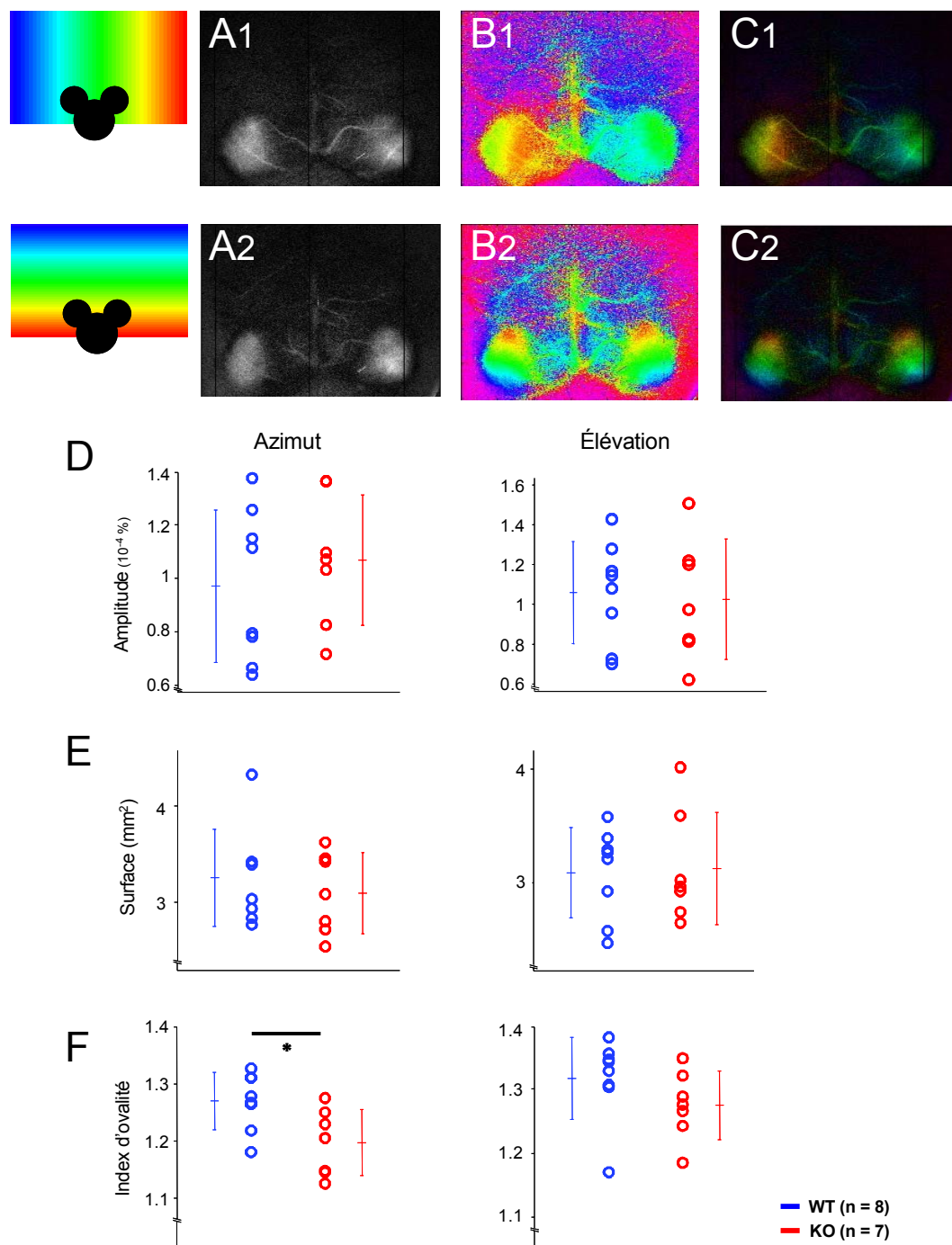


Figure 47. Influence de CB1 sur la forme et l'amplitude de l'activation rétinotopique

(A) Amplitude de la réponse rétinotopique dans le cadre du paradigme de stimulation continue selon l'axe de l'azimet et de l'élévation. (B) Phase de la réponse. (C) Combinaison de la phase et de l'amplitude. (D) Amplitude moyenne mesurée dans les deux aires V1 pour chaque souris sauvage (bleu) et KO (rouge) dans l'axe de l'azimet (à gauche) et de l'élévation (à droite). (E-F) Surface corticale et index d'ovalité (rapport longueur / largeur) de la région.

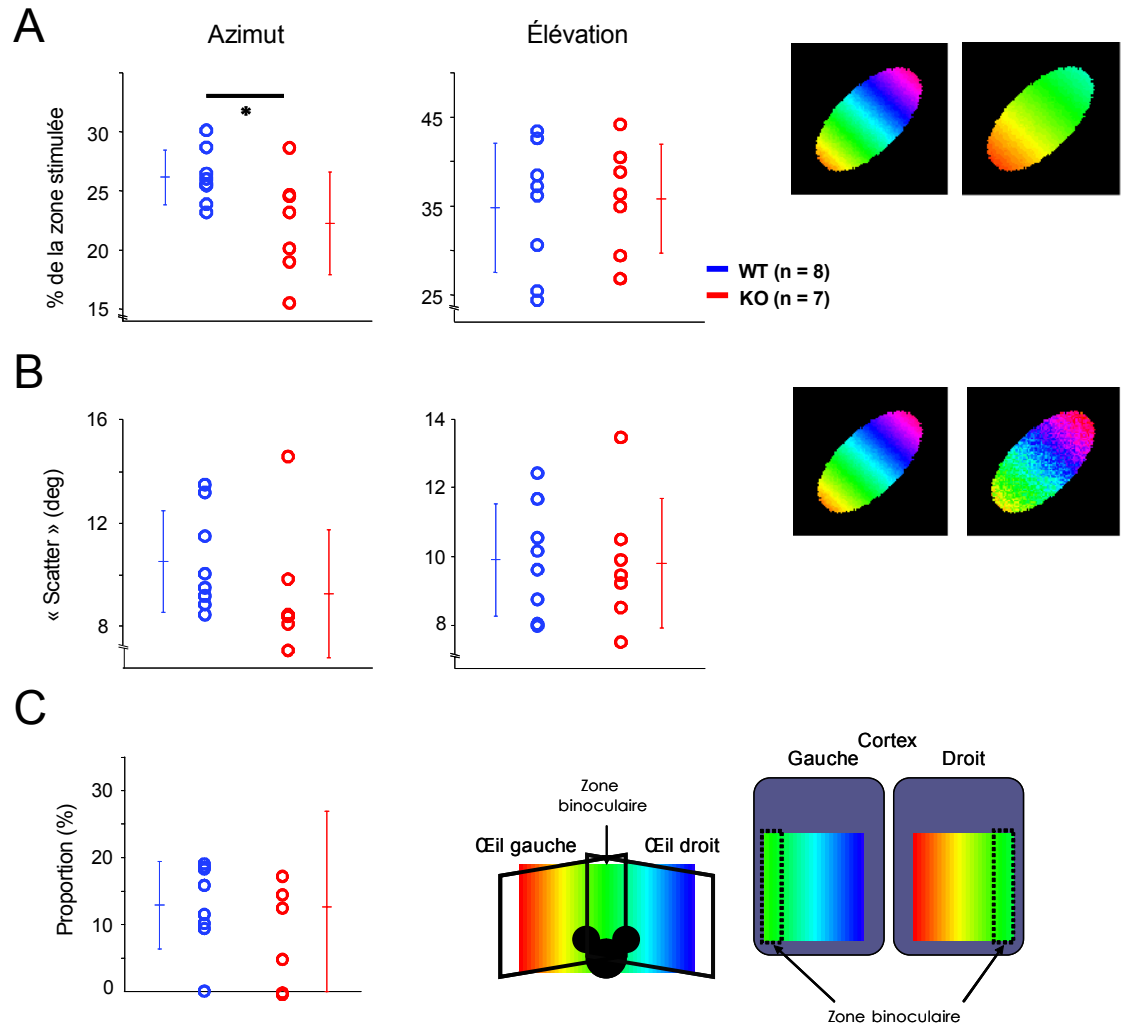


Figure 48. Influence de CB1 sur l'organisation rétinotopique

(A) Portion de zone stimulée pour chaque souris sauvage (bleu) et KO (rouge) dans l'axe de l'azimut (à gauche) et de l'élévation (à droite). Cette mesure évalue l'étendue de la gamme de phase présente dans V1 et permet de mesurer de manière relative l'étendue du champ visuel (voir le schéma à droite). (B) Indice « scatter » calculé tels que décrit par (Cang et al., 2005a). Cette mesure évalue la dispersion moyenne des phases et donne une idée de la spécificité des projections. (C) Proportion de zone binoculaire calculée en mesurant la proportion de phase commune entre les deux hémisphères.

En conclusion, ces résultats montrent un rôle possible de CB1 dans l'organisation des connections géniculo-corticales chez la souris et ce, uniquement dans l'axe de l'azimut. Néanmoins, l'analyse des mesures réalisée ici est encore dans une phase préliminaire et la délimitation des aires V1 a été réalisée manuellement (quoique « en aveugle », i.e. sans connaissance de la souche génétique).

Dans l'avenir nous chercherons à améliorer l'objectivité de la délimitation des régions à partir de nos données en employant une méthode automatique similaire à celle présentée dans l'étude 2. De plus, la construction de cartes rétinotopiques synthétiques provenant des rétinotopies de plusieurs individus d'une souche permettrait de faciliter l'identification des changements induit pas l'absence de CB1 (Gias et al., 2005).

Pour finir, les cellules de la rétine projettent vers le CGL et le collicule supérieur. Récemment Argaw et al. (2008, 2009) ont montré que l'absence de récepteurs CB1 semblait se traduire par une diminution de la ségrégation anatomique de la dominance oculaire dans le collicule supérieur et le CGL. De plus, le retrait d'autres molécules de guidage telles que les éphrines a provoqué des modifications fonctionnelles importantes dans l'organisation rétinotopique du collicule supérieur (Cang et al., 2008b).

Ainsi, l'étude de l'impact fonctionnelle de l'absence de CB1 sur ces deux structures sous-corticales pourrait être envisagée. Toutefois, celles-ci ne sont pas accessibles directement et la technique de l'aspiration du cortex telles que développée dans l'annexe 8.5 et dans les études de Cang et al. (2008) peut s'avérer complexe. Ainsi, le recours à l'imagerie laminaire pourrait permettre un accès à ces structures sous-corticales tout en minimisant les manipulations invasives (Hillman et al., 2007, Belanger et al., 2010).

8.5. Cartes corticales chez le rat

Cette étude a été réalisée dans le cadre du stage de maîtrise de Marouane Nassim du laboratoire et a débouché sur la préparation d'un article présenté ci-après.

Article soumis dans Experimental Brain Research (en révision)

**New Tools for Mapping the Rat Visual Cortex and
Superior Colliculus by Optical Imaging**

M. Nassim¹, M. P. Vanni^{1,2}, and C. Casanova¹

¹Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie,
² Faculté de Médecine
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Christian Casanova
Laboratoire des Neurosciences de la Vision
École d'optométrie
Université de Montréal
CP 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7
Tel. (514) 343-2407
Fax. (514) 343-2382

Web: <http://www.opto.umontreal.ca/neurosciences/>

Acknowledgements: This work was supported by a NSERC grant to C.C. and part of C.C.'s salary was provided by FRSQ (chercheur National). M.P.V. was supported by scholarships from the Government of Canada (Foreign Affairs) and ÉOUM-FESP.

ABSTRACT

Optical brain imaging is a powerful method to characterize the functional organization of visual structures. It has been used in several species to determine the representation of visual space, i.e. the visuotopic organization, in cortical areas. In this study, we investigated the possibility to reveal visuotopic maps in rats using an experimental paradigm based on the continuous stimulation and Fourier decomposition of the signal, recently developed in mice by Kalatsky and Stryker (2003). Experiments were carried out on pigmented and albino rats. Given that optical visual response in rats were rather small in amplitude, we developed a correction method to reduce the noise originating from light fluctuations, which was found to be the major source of noise. This correction considerably increased the signal to noise ratio. Other sources of noise came from respiratory movements and vasomotion. The latter was constituted by two components which peaked at 0.04 and 0.1 Hz and represented a minor cause of noise in both rat types. After correction, visuotopic maps of the primary visual cortex could be acquired in 10 minutes or so. In all animals, the cortical region activated (area V1) was elliptical and visuotopic organizations along the azimuth and elevation were clearly visible. In one case, area V2 was also activated. A new method measuring the cortical magnification factor (CMF) was developed to take advantage of the continuous paradigm. The CMF map was generally homogeneous with a mean factor of 44 $\mu\text{m}/\text{deg}$. Finally, the rat superior colliculus could also be imaged after aspiration of the cortex using the same experimental approach. In conclusion, the combination of light fluctuations correction and continuous stimulation paradigm allows the successful mapping and quantification of visuotopic maps in animal models largely used for the study of retinal diseases such as glaucoma.

INTRODUCTION

It is well established that visual structures in the brain such as the lateral geniculate nucleus, superior colliculus and visual cortex present an orderly representation of the visual space, namely a visuotopic organization. For the past decades, such an organization has been revealed by neuroanatomical-based studies using circumscribed retinal lesions (Laties et Sprague, 1966, Garey et Powell, 1968, Wilson et Toyne, 1970) and electrophysiological-based studies (Siminoff et al., 1966, Lane et al., 1973, Hutchins et Updyke, 1989, Palmer et al., 1978, Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979). In recent years, the complete or partial mapping of visual structures has been used to detect the functional impact of diseases such as glaucoma and macular degeneration (King et al., 2006).

In recent years, optical brain imaging (OBI) of intrinsic signals was successfully used to reveal the functional organization of the cortex in various species such as mice (Schuett et al., 2002, Cang et al., 2005b, Cang et al., 2005c, Cang et al., 2008b, Kalatsky et Stryker, 2003), rats (Gias et al., 2007, Gias et al., 2005), ferrets (Yu et al., 2005) toupaye (Bosking et al., 2000) and monkeys (McLoughlin et al., 2005). Recently, this technique has been used to determine the organization of the superior colliculus in the mouse (Mrsic-Flogel et al., 2005, Cang et al., 2005c, Cang et al., 2008b). Compared to traditional methods such as electrophysiological mapping, OBI has the advantage of avoiding long and tedious recording sessions while offering a high spatial resolution and a detailed representation of the visual maps.

Surprisingly, very few studies using OBI were carried out in rats. This may likely come from the fact that OBI in rat represents a greater challenge due to the overwhelming presence of non-periodic (e.g. emitted light instabilities) and periodic (e.g. respiration, heart beat or vasomotion) noises. Vasomotion, also named “Mayer waves” are low frequency oxymetric waves moving along the cortex which strongly reduces the signal to noise ratio (Japundzic et al., 1990, Mayhew et al., 1996). To our knowledge, only one study addressed the visuotopic organization in rats (Gias et al., 2005) using a standard episodic acquisition method. The visuotopic maps obtained

with this technical approach have a low definition because a limited number of circumscribed visual stimuli are presented in the visual field. One consequence would be a misevaluation of the limits of the visual structures and of the magnification factor, i.e., the scaling factor that relates a distance in the visual field to that on a given visual area (Daniel et Whitteridge, 1961, Pointer, 1986), and that could be critical in experiments aimed at mapping visual structures. Moreover, at the practical level, this method necessitates long recording sessions.

A new approach has been recently described by (Kalatsky et Stryker, 2003) which is based on the continuous stimulation of the visual field and the Fourier decomposition of the signal. In contrast to the standard episodic method, this periodic paradigm allows the stimulation of all regions of the visual field, thus increasing the spatial resolution. In addition, the spectral separation of the signal from periodic noise enables to enhance the quality of the maps and to considerably reduce the acquisition period (generally by a factor of 10).

The goal of this study was three-fold. The first aim was to demonstrate that the continuous stimulation paradigm can be successfully used to quantify the visuotopic organization of the visual cortex and superior colliculus (SC) in albino and pigmented rats, two species extensively used in eye disease models, The second aim was to document the contribution of noise in the signal and develop a method for reducing non periodic fluctuations caused by light instabilities. The third aim was to take advantage of the high resolution of the maps and present a new method for measuring the magnification factor for each pixel. Parts of these data have been presented in abstract form (Nassim et al., 2007).

MATERIAL AND METHODS

Animal preparation

Experiments were carried out in Long Evans (n=5) and Sprague Dawley rats (n= 5) weighing 250-300g. All procedures were done in accordance to the guidelines of the Canadian Council for the Protection of Animals and the Ethics committee on the use of animals of the Université de Montréal. Rats were anaesthetized with urethane (1.25 g/kg ip). The level of anesthesia was monitored throughout the experiment (i.e., using

a leg stretch reflex) and supplemental doses of anesthetic were administered when needed. The rats were first placed in a stereotaxic apparatus using mouth and ear bars. The temperature was maintained at 37.0°C by a feed-back controlled thermometer. Electrocardiogram (ECG) was continuously monitored. A unilateral craniotomy was performed anterior to lambda to expose the visual cortex; the dura mater was left intact. A plastic chamber (in house design; 8 mm in diameter and 2 mm height) was placed over the craniotomy and attached to the skull with dental cement. The chamber was filled with 2% agarose and a glass cover slip was secured to its surface. Atropine sulfate (1%) was used to dilate the pupils and the cornea was protected from desiccation by applying artificial tears (carboxyl methylcellulose). The eyes were fixed with tissue adhesive vet-bond (3M), the skull was attached to a head holder and the ear bars were then removed to free the visual field (see panel A in figure 49). In these experiments, the animals breathed spontaneously with a flow of pure oxygen (0.5 l/min) directed to the nose. All animal received 5 ml (i.p.) of saline solution (0.9%) every six hours to prevent dehydration. In order to map the SC, the overlying cortex was removed by aspiration with an irrigation/aspiration fine plastic needle (Tuberculin syringe) connected to a thermotic drainage pump (model N 765-A). Data acquisition started after a one hour recovery period. The same chamber filled with agar was used. At the end of the experiment, the animal was killed by an overdose of inhaled Isoflurane.

Optical Imaging

For optical imaging, images were captured using a cooled slow-scan CCD camera (12 bits Dalsa camera 1M60) using the Imager 3001 Lab Interface (Optical Imaging Inc). Cortical and sub-cortical surface were illuminated by green light to visualize the vascular pattern. After acquisition of a surface image, the camera was focused 800 μm below the pial surface, and then the visual cortex or SC was illuminated with halogen (Optical Imaging Inc) or mercury arc lamps (X-Cite 120 EXFO) with a 630nm filter. For both lamps, fluctuations of the light emitted caused a major source of signal blurring that prompted us to develop a light correction method presented thereafter.

Visual stimuli and acquisition

Frames were acquired at an 8 Hz rate during 10 min. The visual stimulus was back projected with an NEC projector (Model LT 155) onto a screen subtending 180 x 100 degree of visual angle and placed 25 cm away at an angle of 45 degrees to the eye contralateral to the imaged hemisphere. The cortical and sub-cortical responses were recorded using the imaging method developed by Kalatsky & Stryker 2003. In this method, a temporally periodic stimulus is continuously presented to the animal. The stimulus consisted of a 100% contrast light bar (3 degrees width), horizontally or vertically oriented, drifted on a dark background at a fixed frequency (0.08 to 0.33Hz).

Signal analysis and image processing

To remove the contribution of light fluctuations, raw data was corrected for each pixel (i, j) with:

$$Rc_{i,j,f} = \frac{\left(R_{i,j,f} - \left[S_{i,j} \times \frac{T_f}{\bar{R}} \right] \right)}{S_{i,j}}$$

where $R_{i,j,f}$ and $Rc_{i,j,f}$ are the raw and corrected data. T_f is the light time course, define as:

$$T_f = \frac{1}{XY} \sum_{i=x}^{x+X} \sum_{j=y}^{y+Y} R_{i,j,f}$$

where x, y, X and Y are the position and the size of the region of interest used as a noise reference. $S_{i,j}$ is the map of light average, define as:

$$S_{i,j} = \frac{1}{F} \sum_{f=1}^F R_{i,j,f},$$

and \bar{R} is the light average defined as:

$$\bar{R} = \frac{1}{F} \sum_{f=1}^F T_f$$

where F is the number of frames. The reference region was chosen as a zone with no visual activation, low vascular noise (e.g. no blood vessel) and a high level of illumination. Then this signal was decomposed by Fourier transform to obtain phase and relative magnitude matrixes ($\varphi_{i,j,n}$, related to visuotopy and converted in degrees of visual angle and $A_{i,j,n}$, in percent of variation) as described in the paradigm of Kalatsky and Stryker (2003):

$$Rc_{i,j,f} = \sum_{n=1}^N A_{i,j,n} \cdot \cos(2\pi f_n t + \varphi_{i,j,n})$$

Visuotopic responses were chosen at the frequency of stimulation n allowing the acquisition of $\varphi_{i,j}$ and $A_{i,j}$ maps. When the distribution range of $\varphi_{i,j}$ reached an acceptable value (more than 50% of the visual field represented in the visuotopic map), a cortical magnification factor (CMF) was evaluated on each pixel by using a new method based on the reversed local gradient (see figure 52). First, the blood vessels and the high frequency 2D noise was reduced using low pass filtering:

$$\varphi_{i,j}^G = G_\sigma \otimes \varphi_{i,j}$$

where $\varphi_{i,j}^G$ and $\varphi_{i,j}$ are the filtered and unfiltered visuotopic maps and G_σ a low pass kernel with a cut-off $\sigma = 150\mu\text{m}$. Then the local gradient was computed using:

$$\nabla \varphi_{i,j}^G = \sqrt{\left(\frac{d\varphi_{i,j}^G}{dx}\right)^2 + \left(\frac{d\varphi_{i,j}^G}{dy}\right)^2}$$

where x and y are the image axes in μm and $\nabla \varphi_{i,j}^G$ is the visuotopic gradient in $\text{deg}/\mu\text{m}$. Finally, the CMF (in $\mu\text{m}/\text{deg}$) was considered as the reverse of the local gradient and computed as:

$$CMF_{i,j} = \frac{1}{\nabla \varphi_{i,j}^G}$$

The borders of the region of interest (ROI) were used to calculate an ‘‘ovality Index’’ corresponding to the ratio between the height and width of the ROI.

RESULTS

Signal components.

In most experiments, fluctuation of the emitted light provoked a strong attenuation of the physiological responses precluding any quantification. A representative example is shown in Figure 49 from cortical recordings. Panel B illustrates the temporal profile of the optic signal before and after correcting for light fluctuations (the sudden changes of light levels are indicated by the arrows in graph B1). The Fourier transforms of the signals are shown in panel C. The spectrum for the uncorrected signal was rather complex and the light instability components (mainly distributed in the low frequency range) masked all physiological signals. After correcting the signal, all physiological periodic components could be seen and measured (panel C2). Two vasomotion components were observed (V, inset). The first, made of several peaks, appeared at a mean frequency (\pm SD) of 0.089 ± 0.018 Hz but was not consistently observed across experiments. The second single-peaked was located at a mean of 0.042 ± 0.006 Hz (clearly visible in the temporal space in panel B2). Vasomotor components were also observed in the SC. Respiration components (R in panel C2) were also clearly visible at 1.6 Hz (96 resp/min) and represented an important part of the signal. The heartbeat component was also evident (H). Finally, the stimulus frequency (S), i.e. the visual response, was located at 0.33 Hz. The amplitude of this signal varied considerably across animals (mean \pm SD of $4.9 \pm 2.7 \cdot 10^{-5}$ %) and was optimal for stimulus frequencies ranging between 0.17 and 0.33 Hz. Therefore, the physiological noise came from respiration and vasomotor components and to a lesser extent, heartbeat components. The amplitude of these components was several hundred times greater than that of the visual signal.

The consequences of the above described corrections are illustrated in panel D which show the region of interest (ROI) comprising the primary visual cortex (V1). In panel 2, the fluctuations of light dominated the signal, yielding a visuotopic map (elevation) of very low quality. After correction, there was a noteworthy enhancement of the visual map (panels 3 and 4).

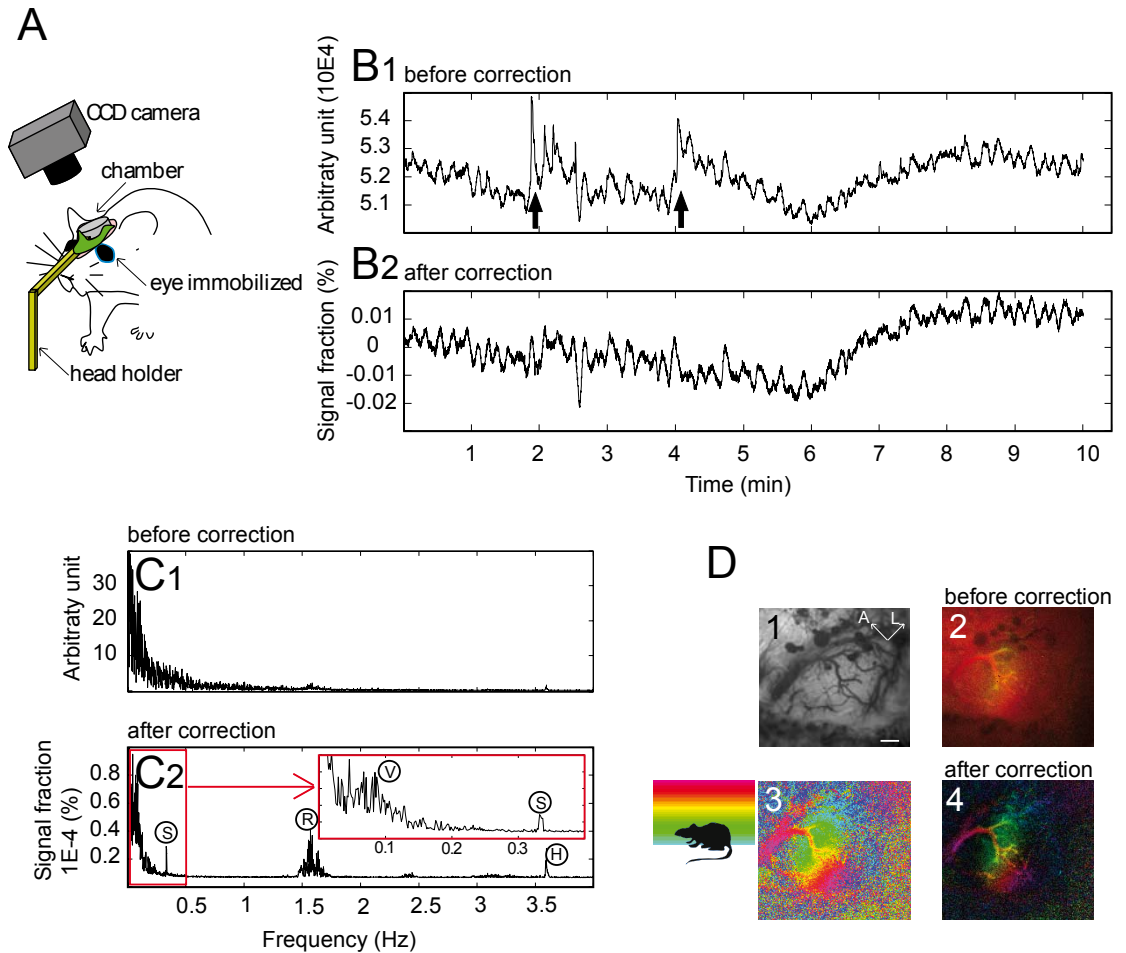


Figure 49. Optical signal in the rat cortex **(A)** schematic representation of the recording setup. **(B)** Temporal profile of the signal recorded in one location of the cortex of an albino rat before (1) and after (2) light fluctuation correction. The visual response was evoked by a moving horizontal bar. The arrows indicate the sudden changes of light level which were removed by the correction. **(C)** Power spectrum on uncorrected and corrected signals. After light fluctuations correction, stimulation (S), respiration (R), heartbeat (H) and vasomotion (V) components can be clearly seen. Because of the sampling frequency used (8Hz), the peak for the heart was always filtered and consequently do not appear at the right frequency on the graph (the peak appearing at 3.6 is in fact located at 4.4 Hz (264 bpm), the Nyquist frequency being at 4 Hz). **(D)** (1) Vascular pattern in the region of interest. (2) Visuotopic map normalized by the amplitude of the signal ($f = 0.333$ Hz) from uncorrected experiment. (3) and (4) shows map before and after being normalized by the amplitude of the signal, after correction. Scale bar = 1 mm.

Visuotopic mapping

The periodic stimulation paradigm was used to acquire azimuth and elevation visuotopic maps in response to vertical and horizontal bars, respectively. Panels A and B of figure 50 shows the change of the visual field representation along the azimuth and elevation on the surface of V1 in a pigmented rat. The naso-temporal progression of the visual field was represented along the latero-medial axis (panel A) while the superior-inferior axis was represented in the caudo-rostral axis of the cortex (panel B). A comparable mapping profile was obtained in albino rats (panels C and D). The activated region was always elliptic (mean ovality index \pm SD = 0.72 ± 0.08) and had a mean area (\pm SD) of $5.02 \pm 2.48 \text{ mm}^2$.

In some cases, a response was also present at the second harmonic level (panel E). The corresponding visuotopic map shown in panel F was characterized by better-defined boundaries. However, the use of the second harmonic duplicates the visuotopic map, yielding incertitude in the visual position represented ($\pm \pi$). Nevertheless, second harmonic analysis can be exploited to improve the limit of the targeted structure and the CMF measures (see below). In one experiment, the activation of V1 was accompanied by the activation, albeit weaker, of a smaller zone lateral to the main functional map, and assumed to be V2 (figure 51). Along the azimuth, this second map showed a transition from lateral to medial, therefore being the mirror image of the visuotopic arrangement observed in V1 (panel A). The elevation map however showed a similar progression along the caudal to rostral axis in both activated regions (panel B).

Superior colliculus. The SC of two pigmented rats was successfully imaged. Given that the overlying cortex had to be removed by aspiration (trauma), optical responses were generally weaker and blood was often present at the collicular surface. Nevertheless, we were able to acquire visuotopic maps as shown in panels C and D of figure 51. As seen in V1, the functional maps along the azimuth (panel C) traveled from the lateral to medial axis while the elevation maps progressed from the caudal to rostral part of the SC (panel D).

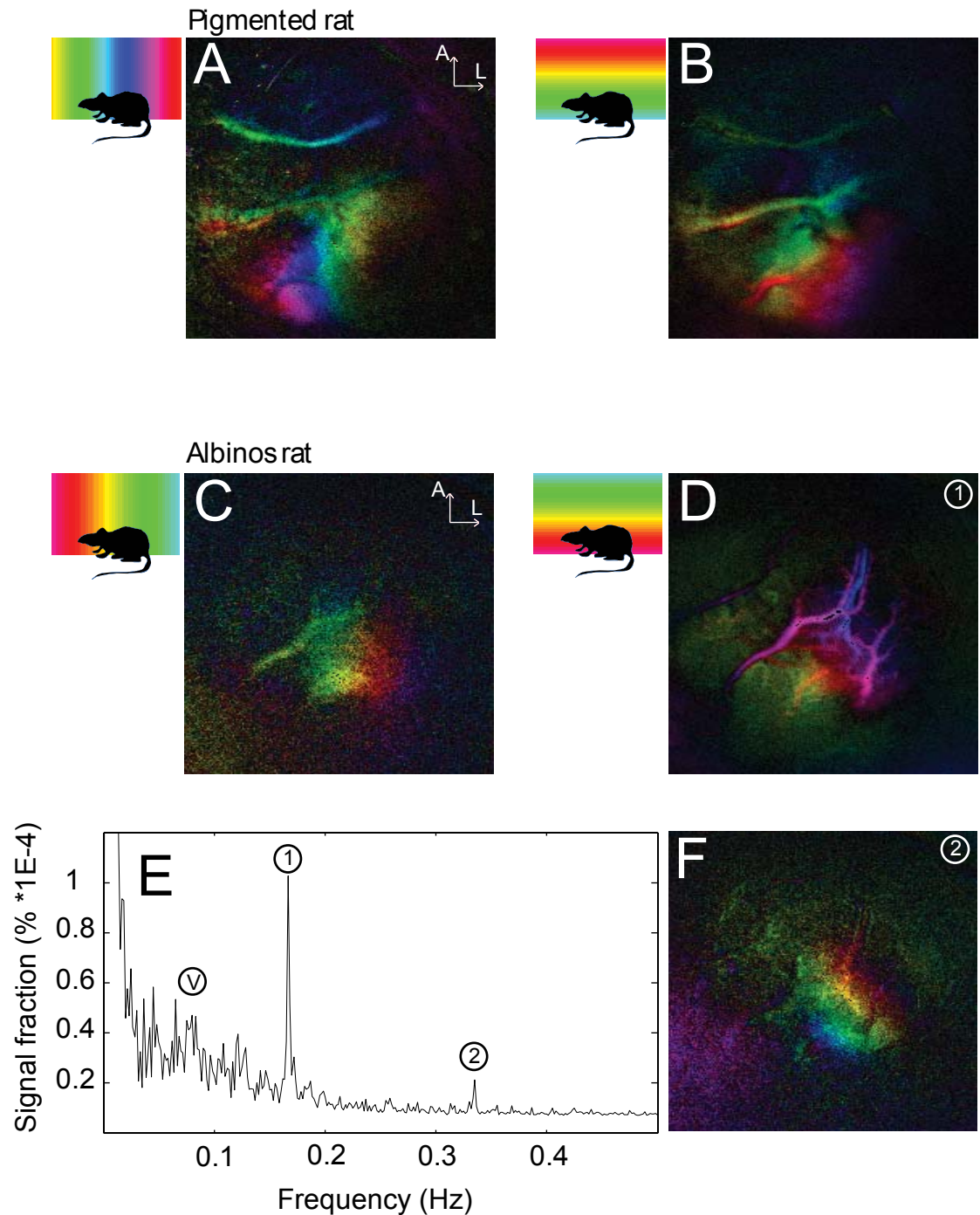
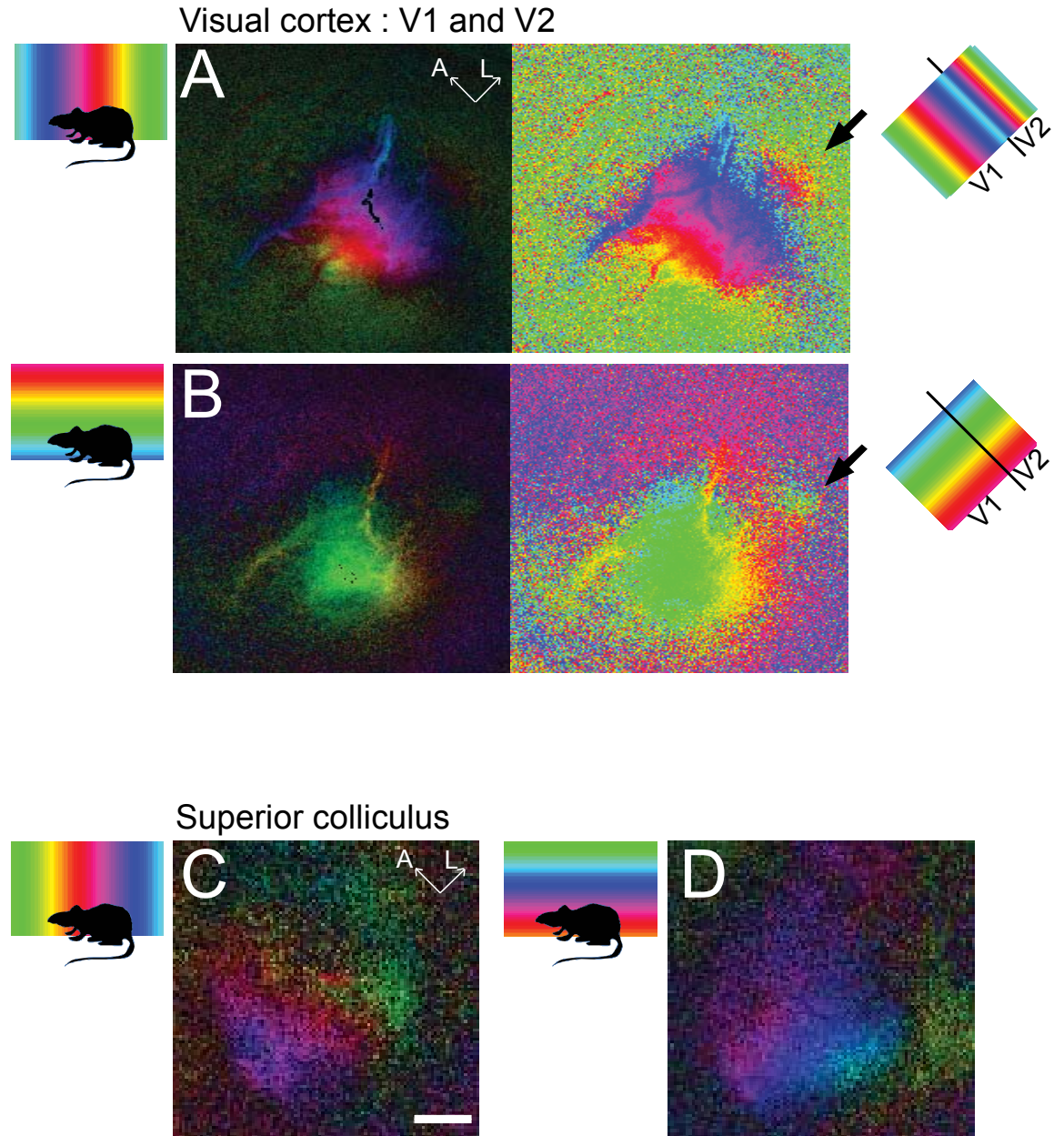


Figure 50. Visuotopic maps of area V1 in a pigmented rat. **(A, B)** Visuotopy map normalized by the amplitude of the signal at the stimulus frequency for azimuth and elevation. **(C, D)** Comparable maps were obtained in an albino rat. **(E)** Power spectrum displaying vasomotor components (V) and first (1) and second (2) harmonics linked to the stimulation. **(F)** Visuotopic map normalized by the amplitude of the signal at twice the stimulus frequency (second harmonic) from the same recording presented in panel D.



Cortical magnification factor. For the cases showing a clear cortical visuotopic arrangement (as in panels A1 and B1 in figure 52), a continuous quantification of the CMF was performed (Figure 52). A low pass filtering was first applied (panels 2), followed by a measure of the local gradients i.e. a measure of the changes of the visual representation on a delimited cortical area (panels 3). A high gradient would indicate a large variation of these changes. Then, the inverse of the gradient was computed and corresponded to the CMF i.e. the changes of cortical surface as a function of the stimulus position in the visual field (panels 4). In the first example (panel A), the progression of the visuotopy along the azimuth was greater in the center of ROI leading to a higher gradient and a lower CMF. The same profile was observed for the elevation map (panel B).

To validate the CMF method, the azimuth and elevation maps were displayed in blocks of 10 x 8 degrees (panel C). We assume that the resulting representation is comparable to the one that would have been obtained with the standard episodic method. As observed for azimuth and elevation continuous CMF maps, activation zones were smaller in the center of the ROI than in the periphery, supporting the findings presented in panels A and B.

The above data confirmed that the continuous CMF can be used to reveal and quantify the changes in cortical topography. In most experiments, the CMF maps were homogeneous throughout the cortex as shown in panel D. Overall, the mean CMF value was $44 \pm 12 \mu\text{m}/\text{deg}$. Finally, when the surrounding 2D noise (see figure 50, panel D) was prominent, the CMF values were over- or under estimated according to the zone considered. A solution was to quantify the CMF from the maps obtained at the second harmonic. An example is shown in panel E. The map at the first harmonic was not homogeneous leading to uncertainty about its limits (panel E1). This was not the case for the second harmonic as the corresponding map appears uniform (panel E2).

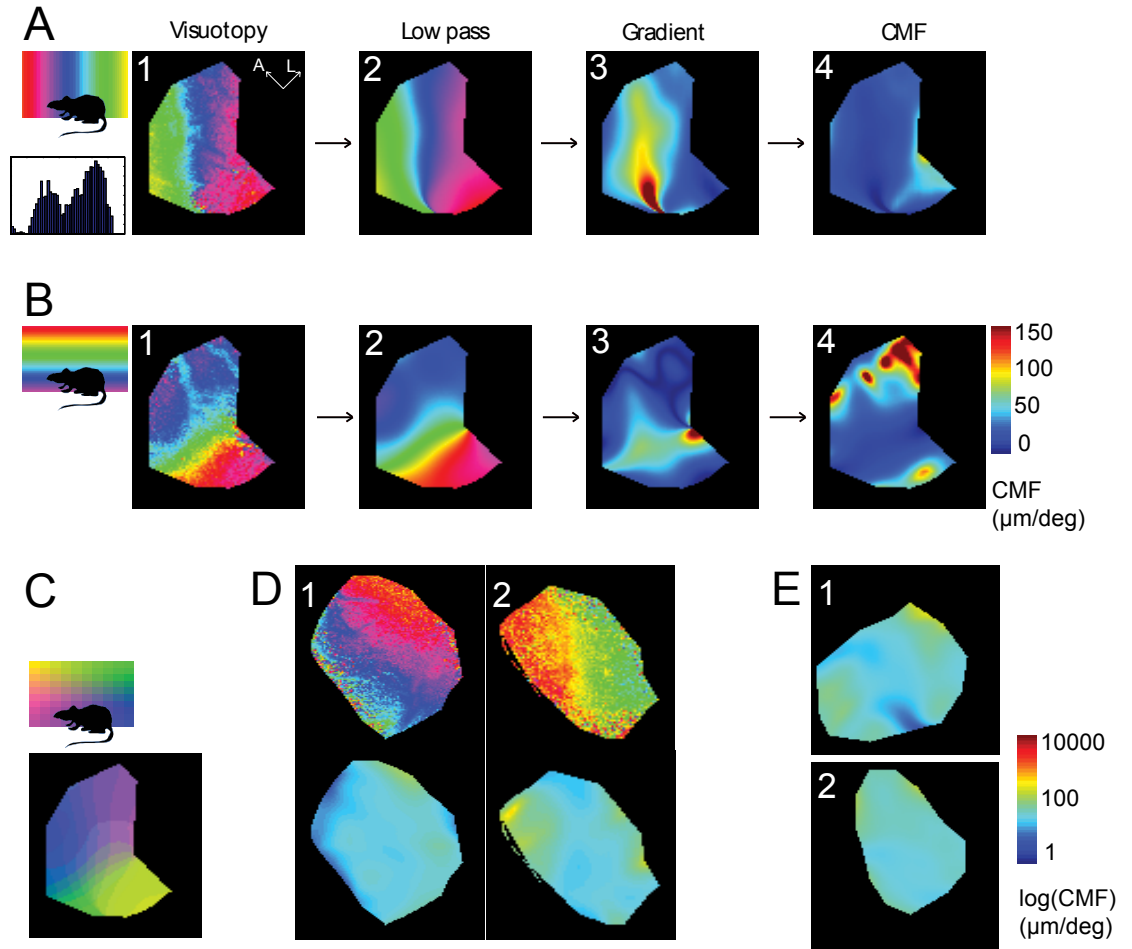


Figure 52. Cortical Magnification Factor. **(A)** (1) Visuotopy at the stimulus frequency along the azimuth.. Method was as follows: (2) low pass filtering, (3) gradient of the filtered visuotopy and (4) inverse of this gradient corresponding to the CMF. The histogram in the inset shows that more than 80% of the visuotopic positions were represented. **(B)** The same procedure was applied for elevation visuotopy. **(C)** Combined azimuth and elevation visuotopy displayed in blocks of 10×8 degrees. **(D)** Other examples of CMF maps from first harmonic signals displayed in a logarithmic scale. **(E)** CMF maps from the first (1) and second (2) harmonics. These maps comes from the visuotopic maps in panels D and F of figure 50.

DISCUSSION

This study showed that the continuous imaging paradigm developed by Kalatsky & Stryker (2003) can be successfully used to map the primary visual cortex and SC of pigmented and albino rats (data not shown). Thanks to this paradigm, visual maps can be obtained in a short time period (10 minutes); this last aspect being critical when investigating the immediate effect of experimental manipulations. It also showed that a major source of noise comes from light fluctuations. This problem was overcome by developing a correction method which considerably improved the signal. Finally, continuous visuotopic maps were characterized and exploited to develop a measure of local cortical magnification, the CMF. The development of a pixel-wise measure of CMF presents several interests. This quantification can be particularly useful to determine very detailed visuotopic patterns that would not be noticeable otherwise. Also, a major advantage of the CMF measure is to be able to characterize circumscribed (i.e. selected region of a visual structure) and relative (i.e. uncorrected by the hemodynamic delay) visuotopic maps.

Technical considerations. In the first steps of this project, imaging the visual cortex of the rat proved to be difficult compared to other animal species used in the laboratory such as mice, cats and toupayes. Anesthesia was found to be an important factor. Initially, animals were anesthetized with a gas mixture of O₂ and Isoflurane. In contrast to halothane, another volatile anesthetic, Isoflurane has little impact on cardio-vascular function and intra-cranial pressure (Drummond et al., 1983; Todd and Drummond, 1984; Frost, 1984), making this drug a good candidate for anesthesia for rat optical imaging experiments. This was not the case as no reliable maps of the primary visual cortex could be obtained under Isoflurane anesthesia. This anesthetic is known to exert a strong depressive effect on cortical responses in cats (Villeneuve et Casanova, 2003) and it may have the same detrimental effect in rats. Isoflurane was abandoned and anesthesia was induced by Urethane even if this drug has been shown to depress cortical activity in rats (Girman et al., 1999). On the other hand, urethane is known to exert minimal effects on cardiovascular and respiratory systems (Hara et Harris, 2002, Koblin, 2002). Switching to urethane-based anesthesia was

effective as it became easier to acquire stable and reproducible functional maps of the primary visual cortex.

Light fluctuations represented the major source of noise in our experiments, as it might be for other laboratories, despite of our efforts to address this problem in a practical way (e.g. two technologies tested: halogen and arc lamps, stabilization of the power supply, additional cooling of the lamp). In presence of this noise, no quality or robust maps could be obtained and quantification was almost impossible. While Fourier decomposition is a suitable method to analyse periodic signals, non-periodic events such as light instabilities are quite complex to resolve in the frequency domain. By selecting a reference profile of light fluctuations, we were able to correct the raw signal and strongly enhance the visual responses. The main problem of this signal correction lies in the choice of the region of interest to be considered as noise reference. In an ideal situation, this region should not have any physiological signals, and that was virtually impossible in our case given that the skull was not present in the field of view. Nevertheless, the use of a non visual part of the cortex allowed us to adequately remove the fluctuations with little interference on physiological signals. In contrast to light instability profiles, each of the physiological components are not appearing at the same moment in the different parts of the cortex.

The second main source of noise to deal with came from the animal respiration. This noise may have originated from breathing movements passed on to the skull since the animal's head was only secured by a head holder. In support of this assumption, respiratory signals were barely noticeable in our cat preparations (with the head more firmly held by mouth and ear bars; data not shown). Nevertheless, this noise was not critical as it did not overlap with the signal frequency. The third source of noise came from the constriction/dilation of arterial blood vessels. Vasomotor oscillations are happening spontaneously at a frequency lower than that of respiration (Japundzic et al., 1990, Mayhew et al., 1996). Despite initial worries, we found that vasomotion was not a major source of noise. These noise components were not present in all experiments and their frequency (generally peaking at both ~ 0.04 and ~ 0.09 Hz) was lower than that of the visual signal. Despite the invasive surgery

necessary to uncover the SC, vasomotion was also recorded in this structure, suggesting that the surgical procedure did not alter its local blood flow.

The stimulus frequencies used in the present study were thus chosen so that they will not overlap with respiratory and vasomotor components. The best responses were recorded between 0.17 - 0.33 Hz. In a parallel study, we determined that such frequencies are indeed ideal to maximally exploit the signal revealed via the hemodynamic response (Vanni et al., submitted).

Visuotopic maps in the visual cortex and superior colliculus. To our knowledge, only Gias et al. (2005) characterized the visuotopic organization of the visual cortex with OBI in normal rats. Our findings are comparable to theirs as they showed the existence of an orderly representation of the contralateral visual field, characteristic of that obtained by electrophysiological mapping (Montero et al., 1973). A difference between Gias et al. (2005) study and ours is the method used to acquire the maps. These authors used the conventional episodic method which necessitates the averaging of the signals, increasing substantially the recording period (our experience is that a visuotopic testing period would last hours instead of minutes; data not shown) and reducing the resolution of the visuotopic maps. In theory, maps obtain with the periodic stimulation paradigm could be made from an infinite number of points of the visual field (Kalatsky et Stryker, 2003).

In all functional maps recorded in the present work, the contour of the primary visual cortex was elliptical, in accordance with previous studies based on electrophysiological recordings (Espinoza et Thomas, 1983, Montero et al., 1973, Rumberger et al., 2001). However, the surface of the activated regions was smaller (around 2 mm²) than that reported by others (Espinoza et Thomas, 1983, Gias et al., 2005, Rumberger et al., 2001). This is likely due to the fact that our setup did not allow for the stimulation of the more temporally located part of the visual field. Also, since we used a flat screen, the bar in the extreme nasal and temporal part of the screen may have appeared thinner and slower to the animal and thus may have been less optimal to stimulate the corresponding regions of the cortex. It is worth mentioning that, in this project, we did not intend to obtain a mapping of the entire

visual field, but rather determine the usefulness of the continuous stimulation paradigm in rat and develop tools for noise reduction and magnification quantification. Another possibility for the underestimation of the cortical surface comes from the fact that, in some cases, the stimulus frequency was close to the vasomotor components. In these cases, a 2D vascular noise pattern was superimposed on the 2D visuotopic pattern yielding an incomplete estimation of the limits of the activated area, thus inserting additional variability between the estimation of the cortical surface across animals. This problem was solved by using visuotopic maps from second harmonic signals. It is indeed known that noise components (such as vasomotion) are virtually absent at higher frequencies (Mayhew et al., 1996).

In all but one experiments, no significant activation beyond area V1 was seen. For one animal, a second visuotopic representation, smaller in size and amplitude and lateral and slightly posterior to the primary visual cortex was detected, comparable to that found by Gias et al (2005). Based on its position and dimension, this region is likely to correspond to area V2 (Adams et Forrester, 1968, Espinoza et Thomas, 1983, Rumberger et al., 2001, Montero, 1993). The lack of consistent and reproducible responses from the assumed V2 area may come from the fact that the visual stimulation parameters were chosen to optimally activate V1 (and not necessarily V2).

Finally, the present study reports for the first time that the visuotopic organization of the rat superior colliculus can be investigated with optical imaging. Comparable data were obtained in another rodent, the mouse (Cang et al., 2005c, Cang et al., 2008b, Mrcic-Flogel et al., 2005). Our results show a similar progression of the representation of the visual field as that reported in electrophysiological mapping studies (Rhoades et al., 2000); i.e. in which the superior visual field is represented caudally and the nasal visual field is represented laterally. The amplitude of the optical signal was weaker than that of the cortex, perhaps because of the removal of cortico-tectal fibers (believed to exert a facilitation (Goodale, 1973)) and the trauma associated with the aspiration of the cortex. The possibility to map the

visual space in the SC is of great interest when considering animal models of pathologies in which ganglion cells are affected (i.e. glaucoma). Indeed, it is known that all ganglion cells directly projects in a orderly manner in the SC, allowing then an assessment of the visual processing only one synapse away from retinal ganglion cells.

(Références en fin de section)

8.6 Stimulations planes

L'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse a été affecté de différentes façons par un artefact de stimulation inhérent au mode de présentation des stimuli. En effet, alors que le champ visuel est radial, la présentation des stimuli s'est faite sur un écran plat positionné face à l'animal. L'extrême majorité des études en vision utilisent ce type de stimulation qui est pratiquement sans conséquence lorsque l'excentricité des stimuli est réduite. Par contre, lorsque l'excentricité augmente, la dimension des stimuli présentés sur l'écran ne changeant pas, donc l'angle visuel par lequel ils sont acquis par l'œil diminue (figure 53). Ainsi, en fonction de l'excentricité, les stimuli paraissent, plus petits, plus lents et moins périphériques qu'ils ne devraient l'être.

A titre d'exemples, dans l'étude 1, les tailles étaient perçues plus petites qu'elles ne devaient l'être et de ce fait, les diamètres optimaux ont pu être surévalués. À l'inverse, les positions des stimuli étaient moins excentrées ce qui a probablement affecté la relation entre les diamètres optimaux et l'élévation des stimuli.

En ce qui concerne l'étude 2 et 3a, l'évaluation de la fréquence spatiale optimale à forte excentricité a pu également être affectée. En effet, du fait de la réduction de la taille apparente des stimuli, la fréquence spatiale peut être perçue plus haute. De ce fait, les fréquences spatiales optimales ont pu être sous-évaluées en fonction de l'excentricité. Cela a probablement introduit un biais dans la relation entre le ratio et la fréquence spatiale dans l'étude 3a.

Dans l'étude 3a, la rétinitopie a également pu être affectée dans la mesure où la couverture du champ visuel était moins ample que voulu. Il est également possible qu'aux plus fortes excentricités, la vitesse apparente de la barre ait été trop lente pour évoquer une réponse neuronale suffisante réduisant ainsi l'étendue de l'activation rétinitopique. Si la vitesse des barres avait néanmoins été suffisante, la réponse qu'elles ont évoquée a possiblement introduit un autre biais en provoquant une surévaluation de la taille du champ récepteur.

Toutefois, cet artefact de stimulation est moins critique chez le chat que sur des modèles de rongeurs chez lesquels le champ visuel est beaucoup plus ample. De plus, l'ensemble des études ont été réalisées en comparant des paramètres relatifs entres

plusieurs structures dans lesquelles la contribution de cet artefact est à priori la même (e.g. taille des champs récepteurs ou fréquence spatiale entre l'aire 17, 18 et 21a).

Dans le futur, il serait envisageable de corriger à *posteriori* les paramètres réellement perçus des stimuli en fonction de la rétinotopie à partir des données. Malgré cela, la correction de la stimulation elle-même semble une voie plus appropriée et durable. Bien que possible, l'option d'un environnement immersif est pour l'instant trop complexe, onéreuse et assez incompatible avec les préparations neurophysiologiques qui nécessitent un accès facile à l'animal et impose un encombrement stérique important (e.g. caméra, illumination, stéréotaxe, système d'anesthésie, électrodes, cage de Faraday, ...).

Une autre option serait de transformer la stimulation, au sein de la présentation vidéo, en donnant l'illusion d'une courbure tout en conservant le même dispositif de stimulation plane (moniteur ou vidéoprojecteur).

Lorsqu'aucune correction n'est effectuée, les carrés d'un damier sont vus plus petits en périphérie (distorsion en barillet). L'idée serait de contrecarrer ce phénomène en introduisant une déformation dans la stimulation : les carrés périphériques du damier seraient présentés plus grands (déformation en coussinet) de manière à ce que l'angle visuel vu par les yeux soit identique en tout point de l'écran permettant ainsi la perception d'un damier homogène (figure 53).

Bien qu'indépendant de la « stimulation sur écran plat », un autre artefact de stimulation a également été présent dans l'étude 3b. Les changements continus de direction du stimulus en mouvement linéaire ont en effet introduit un mouvement linéaire additionnel en fonction de l'excentricité. Cet artefact se manifestait par une réduction et une augmentation de la vitesse apparente de part et d'autre du centre des stimulations (figure 53).

Sa contribution était d'autant plus importante que la rotation était rapide, la vitesse du stimulus faible et l'excentricité importante. Son effet était donc plus présent dans l'aire 17, dont les neurones sont sélectifs à des mouvements plus lents que dans l'aire 18. En utilisant le paradigme présenté dans l'étude 3b, il convient donc, de réduire autant que possible, la taille et la fréquence des stimulations pour minimiser cet artefact.

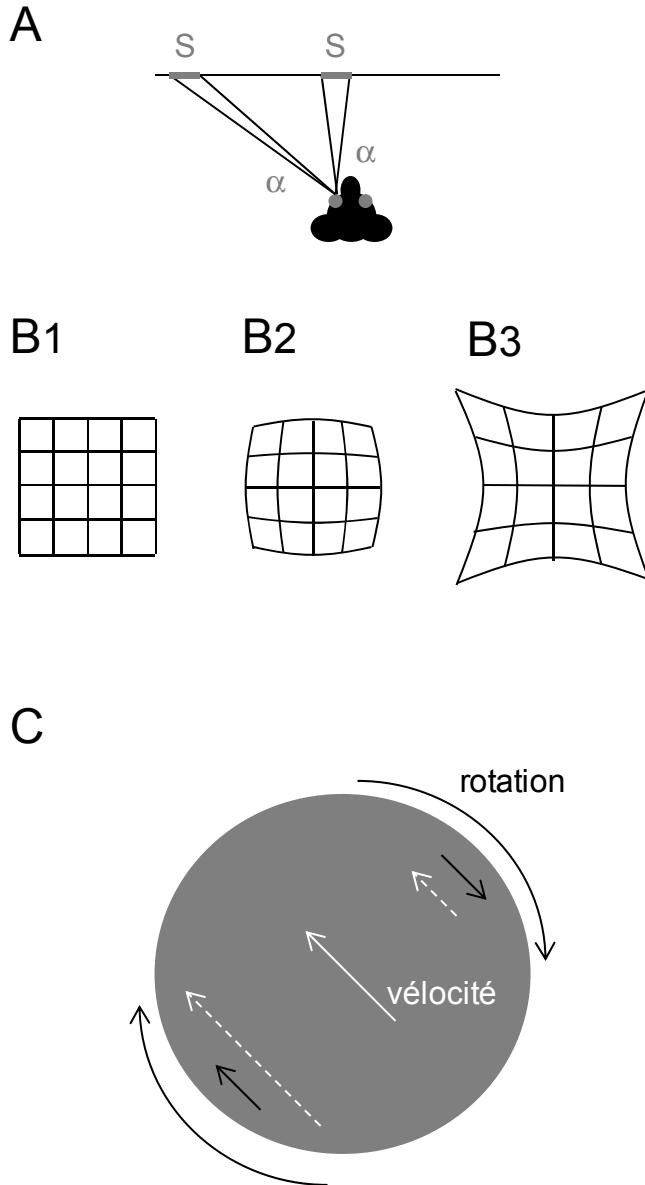


Figure 53. Artefacts de stimulation (A) Schématisation de la réduction de l'angle visuel α en fonction de l'excentricité pour un stimulus S de taille constante sur un écran plat. (B) Du fait de cette distorsion, les positions excentrées d'un carré (B1) sont perçues plus petites (B2). Afin de pouvoir contrecarrer ce phénomène, une distorsion à l'inverse peut être présentée (B3). (C) Artefact induit par le mode de présentation en stimulation continu. En blanc : vélocité du stimulus, en noir : vélocité additionnelle induite par la rotation, en blanc pointillé : la vélocité réellement perçue.

8.7 References

- ADAMS, A. D. & FORRESTER, J. M. 1968. The projection of the rat's visual field on the cerebral cortex. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 53, 327-36.
- ARGAW, A., DUFF, G., PTITO, M. & BOUCHARD, J.-F. 2008. Contribution of the endocannabinoid CB1 receptor during axon guidance *SfN abstract*, prog. 624.1.
- ARGAW, A., DUFF, G., TEA, N., PTITO, M. & BOUCHARD, J.-F. 2009. The endocannabinoid system modulates axon guidance and target selection during development *SfN abstract*, prog. 129.8.
- BELANGER, S., ABRAN, M., INTES, X., CASANOVA, C. & LESAGE, F. 2010. Real-time diffuse optical tomography based on structured illumination. *J Biomed Opt*, 15, 016006.
- BOSKING, W. H., CROWLEY, J. C. & FITZPATRICK, D. 2002. Spatial coding of position and orientation in primary visual cortex. *Nat Neurosci*, 5, 874-82.
- BOSKING, W. H., KRETZ, R., PUCAK, M. L. & FITZPATRICK, D. 2000. Functional specificity of callosal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci*, 20, 2346-59.
- BOSKING, W. H., ZHANG, Y., SCHOFIELD, B. & FITZPATRICK, D. 1997. Orientation selectivity and the arrangement of horizontal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci*, 17, 2112-27.
- CANG, J., KALATSKY, V. A., LOWEL, S. & STRYKER, M. P. 2005a. Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse. *Vis Neurosci*, 22, 685-91.
- CANG, J., KANEKO, M., YAMADA, J., WOODS, G., STRYKER, M. P. & FELDHEIM, D. A. 2005b. Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron*, 48, 577-89.
- CANG, J., NIELL, C. M., LIU, X., PFEIFFENBERGER, C., FELDHEIM, D. A. & STRYKER, M. P. 2008a. Selective disruption of one Cartesian axis of cortical maps and receptive fields by deficiency in ephrin-As and structured activity. *Neuron*, 57, 511-23.
- CANG, J., RENTERIA, R. C., KANEKO, M., LIU, X., COPENHAGEN, D. R. & STRYKER, M. P. 2005c. Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron*, 48, 797-809.
- CANG, J., WANG, L., STRYKER, M. P. & FELDHEIM, D. A. 2008b. Roles of ephrin-as and structured activity in the development of functional maps in the superior colliculus. *J Neurosci*, 28, 11015-23.
- CARANDINI, M. & SENGPIEL, F. 2004. Contrast invariance of functional maps in cat primary visual cortex. *J Vis*, 4, 130-43.
- DANIEL, P. M. & WHITTERIDGE, D. 1961. The representation of the visual field on the cerebral cortex in monkeys. *J Physiol*, 159, 203-21.
- DUNN, A. K., DEVOR, A., DALE, A. M. & BOAS, D. A. 2005. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage*, 27, 279-90.
- ESPINOZA, S. G. & THOMAS, H. C. 1983. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat. *Brain Res*, 272, 137-44.

- GAREY, L. J. & POWELL, T. P. 1968. The projection of the retina in the cat. *J Anat*, 102, 189-222.
- GIAS, C., HEWSON-STOATE, N., JONES, M., JOHNSTON, D., MAYHEW, J. E. & COFFEY, P. J. 2005. Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage*, 24, 200-6.
- GIAS, C., JONES, M., KEEGAN, D., ADAMSON, P., GREENWOOD, J., LUND, R., MARTINDALE, J., JOHNSTON, D., BERWICK, J., MAYHEW, J. & COFFEY, P. 2007. Preservation of visual cortical function following retinal pigment epithelium transplantation in the RCS rat using optical imaging techniques. *Eur J Neurosci*, 25, 1940-8.
- GOODALE, M. A. 1973. Cortico-tectal and intertectal modulation of visual responses in the rat's superior colliculus. *Exp Brain Res*, 17, 75-86.
- HARA, K. & HARRIS, R. A. 2002. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg*, 94, 313-8, table of contents.
- HARKANY, T., GUZMAN, M., GALVE-ROPERH, I., BERGHUIS, P., DEVI, L. A. & MACKIE, K. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 83-92.
- HILLARD, C. J. 2000. Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther*, 294, 27-32.
- HILLMAN, E. M., DEVOR, A., BOUCHARD, M. B., DUNN, A. K., KRAUSS, G. W., SKOCH, J., BACSKAI, B. J., DALE, A. M. & BOAS, D. A. 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *Neuroimage*, 35, 89-104.
- HUSSON, T. R., MALLIK, A. K., ZHANG, J. X. & ISSA, N. P. 2007. Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci*, 27, 8665-75.
- HUTCHINS, B. & UPDYKE, B. V. 1989. Retinotopic organization within the lateral posterior complex of the cat. *J Comp Neurol*, 285, 350-98.
- JAPUNDZIC, N., GRICHOIS, M. L., ZITOUN, P., LAUDE, D. & ELGHOZI, J. L. 1990. Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *J Auton Nerv Syst*, 30, 91-100.
- KAAS, J. H., HALL, W. C., KILLACKEY, H. & DIAMOND, I. T. 1972. Visual cortex of the tree shrew (*Tupaia glis*): architectonic subdivisions and representations of the visual field. *Brain Res*, 42, 491-6.
- KALATSKY, V. A. & STRYKER, M. P. 2003. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron*, 38, 529-45.
- KING, W. M., SARUP, V., SAUVE, Y., MORELAND, C. M., CARPENTER, D. O. & SHARMA, S. C. 2006. Expansion of visual receptive fields in experimental glaucoma. *Vis Neurosci*, 23, 137-42.
- KOBLIN, D. D. 2002. Urethane: help or hindrance? *Anesth Analg*, 94, 241-2.
- LANE, R. H., ALLMAN, J. M., KAAS, J. H. & MIEZIN, F. M. 1973. The visuotopic organization of the superior colliculus of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) and the bush baby (*Galago senegalensis*). *Brain Res*, 60, 335-49.
- LATIES, A. M. & SPRAGUE, J. M. 1966. The projection of optic fibers to the visual centers in the cat. *J Comp Neurol*, 127, 35-70.

- MAYHEW, J. E., ASKEW, S., ZHENG, Y., PORRILL, J., WESTBY, G. W., REDGRAVE, P., RECTOR, D. M. & HARPER, R. M. 1996. Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage*, 4, 183-93.
- MCLOUGHLIN, N., COTTON, P. & SCHIESSL, I. 2005. A continuous smooth map of space in the primary visual cortex of the common marmoset. *Perception*, 34, 967-74.
- MOLDRICH, G. & WENGER, T. 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21, 1735-42.
- MONTERO, V. M. 1993. Retinotopy of cortical connections between the striate cortex and extrastriate visual areas in the rat. *Exp Brain Res*, 94, 1-15.
- MONTERO, V. M., ROJAS, A. & TORREALBA, F. 1973. Retinotopic organization of striate and peristriate visual cortex in the albino rat. *Brain Res*, 53, 197-201.
- MRSIC-FLOGEL, T. D., HOFER, S. B., CREUTZFELDT, C., CLOEZ-TAYARANI, I., CHANGEUX, J. P., BONHOEFFER, T. & HUBENER, M. 2005. Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci*, 25, 6921-8.
- MURPHY, E. H. & BERMAN, N. 1979. The rabbit and the cat: a comparison of some features of response properties of single cells in the primary visual cortex. *J Comp Neurol*, 188, 401-27.
- NASSIM, M., VANNI, M. & CASANOVA, C. 2007. Mapping visual structures in the rat by optical brain imaging. *SFN, San Diego*, Prog. 920.6.
- PALMER, L. A., ROSENQUIST, A. C. & TUSA, R. J. 1978. The retinotopic organization of lateral suprasylvian visual areas in the cat. *J Comp Neurol*, 177, 237-56.
- POINTER, J. S. 1986. Visual representation at the cerebral cortex: qualitative and quantitative aspects. *Ophthalmic Physiol Opt*, 6, 171-5.
- RHOADES, R. W., MOONEY, R. D. & FISH, S. E. 2000. Retinotopic and Visuotopic representations in the mammalian Superior Colliculus. *Vision and Visual Dysfunction, Neuroanatomy of the Visual Pathways and their development*, Eds B. Dreher and S.R. Robinson. Gen Ed. J.R. Cronly-Dillon, chapter 4, 150-175.
- RUMBERGER, A., TYLER, C. J. & LUND, J. S. 2001. Intra- and inter-areal connections between the primary visual cortex V1 and the area immediately surrounding V1 in the rat. *Neuroscience*, 102, 35-52.
- SCHUETT, S., BONHOEFFER, T. & HUBENER, M. 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci*, 22, 6549-59.
- SHMUEL, A. & GRINVALD, A. 1996. Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *J Neurosci*, 16, 6945-64.
- SIMINOFF, R., SCHWASSMANN, H. O. & KRUGER, L. 1966. An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol*, 127, 435-44.

- THOMPSON, J. M., WOOLSEY, C. N. & TALBOT, S. A. 1950. Visual areas I and II of cerebral cortex of rabbit. *J Neurophysiol*, 13, 277-88.
- TUSA, R. J., PALMER, L. A. & ROSENQUIST, A. C. 1978. The retinotopic organization of area 17 (striate cortex) in the cat. *J Comp Neurol*, 177, 213-35.
- TUSA, R. J., ROSENQUIST, A. C. & PALMER, L. A. 1979. Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol*, 185, 657-78.
- VAN HOOSER, S. D. 2007. Similarity and diversity in visual cortex: is there a unifying theory of cortical computation? *Neuroscientist*, 13, 639-56.
- VANNI, M. P., PROVOST, J., LESAGE, F. & CASANOVA, C. submitted. Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *Journal of Neuroscience Methods*.
- VILLENEUVE, M. Y. & CASANOVA, C. 2003. On the use of isoflurane versus halothane in the study of visual response properties of single cells in the primary visual cortex. *J Neurosci Methods*, 129, 19-31.
- WILSON, M. E. & TOYNE, M. J. 1970. Retino-tectal and cortico-tectal projections in *Macaca mulatta*. *Brain Res*, 24, 395-406.
- WILSON, R. I. & NICOLL, R. A. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296, 678-82.
- YU, H., FARLEY, B. J., JIN, D. Z. & SUR, M. 2005. The coordinated mapping of visual space and response features in visual cortex. *Neuron*, 47, 267-80.
- ZHAN, C. A. & BAKER, C. L., JR. 2008. Critical spatial frequencies for illusory contour processing in early visual cortex. *Cereb Cortex*, 18, 1029-41.
- ZHAN, C. A., LEDGEWAY, T. & BAKER, C. L., JR. 2005. Contrast response in visual cortex: quantitative assessment with intrinsic optical signal imaging and neural firing. *Neuroimage*, 26, 330-46.