



HAL
open science

Implication des circuits neuronaux du cortex somatosensoriel dans l'initiation de l'activité paroxystique de l'épilepsie absence

Florian Studer

► **To cite this version:**

Florian Studer. Implication des circuits neuronaux du cortex somatosensoriel dans l'initiation de l'activité paroxystique de l'épilepsie absence. Neurobiologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT: 2018GREAV009. tel-02554916

HAL Id: tel-02554916

<https://theses.hal.science/tel-02554916>

Submitted on 27 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Florian STUDER

Thèse dirigée par **Antoine DEPAULIS**

Préparée au sein de **L'institut des Neurosciences de Grenoble
INSERM U1216**

Dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Implication des circuits neuronaux du cortex somatosensoriel dans l'initiation de l'activité paroxystique de l'épilepsie absence.

Thèse soutenue publiquement le **26 avril 2018**,
devant le jury composé de :

Dr. Laurent BOURDIEU

Directeur de Recherche, IBENS, Rapporteur

Dr. Sylvain CROCHET

Chargé de Recherche, EPFL, Rapporteur

Dr. Ingrid BUREAU

Chargé de Recherche, INMED, Examineur

Dr. Stéphane CHARPIER

Professeur, ICM, Examineur

Dr. Rémy SADOUL

Professeur, GIN, Président du jury

Dr. Antoine DEPAULIS

Directeur de Recherche, GIN, Directeur de thèse



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les Docteurs Laurent Bourdieu et Sylvain Crochet pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite également remercier les Docteurs Ingrid Bureau, Stéphane Charpier et Rémy Sadoul pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Un merci tout particulier à Ingrid Bureau et Stéphane Charpier qui ont suivi de près ce travail en participant à mon comité de suivi de thèse ; vos commentaires et suggestions m'ont beaucoup aidé à avancer dans mon projet.

Un grand merci à Antoine Depaulis. Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe, merci pour ton enthousiasme et ta générosité. Merci aussi de m'avoir laissé la liberté de développer mes idées et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse.

Merci à Guillaume, Célia et Emel pour les bons moments passés au labo et pour les apéros. Mais bien sur rien n'aurait été pareil sans Noël Flantier et ce bon Slimane...

Merci à Guillaume pour l'initiation « expresse » à la programmation, pour les discussions enflammées et l'initiation au ski de fond ; c'est un peu à grâce à toi si Martin envie ma glisse aujourd'hui ...

Merci aussi à tous les membres de l'équipe. Merci à Isabelle, Colin, Christophe, Nathalie, Claire, Céline, Rory... Merci pour votre bonne humeur, votre aide et vos conseils !

Merci à Raphaël et Benoit qui m'ont mis le pied à l'étrier. Merci pour votre disponibilité et pour les réunions de travail autour d'un bon repas...

Merci à François, Elke et Christian pour les bons moments passés sur ID 17.

Je veux aussi dire un grand merci à mes parents et ma sœur qui m'ont soutenu depuis le début. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagné pendant ces années prenantes. J'ai aussi une pensée émue pour mes grands-parents ...

Merci à Rémi, Sylvie et Lou qui m'ont accueilli les bras grands ouverts dans leur famille !

Un grand merci à Hélène, Julie et Kevin. Je n'ai pas été très présent ces derniers temps mais je compte bien me rattraper...

Enfin merci à Zoé pour ton soutien, ton humour, ta patience, ta bienveillance et ton amour.

Tu m'as suivi dans les montagnes malgré ton aversion pour le ski... Je t'aime !

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATIONS..... | 1 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX : | 3 |
| AVANT-PROPOS..... | 5 |
| INTRODUCTION | 9 |
| Le cortex | 10 |
| 1. Composition cellulaire | 10 |
| 1.1. Les cellules gliales..... | 11 |
| 1.2. Les neurones | 12 |
| 1.2.1. Les neurones excitateurs..... | 13 |
| 1.2.2. Les neurones inhibiteurs | 14 |
| 2. Organisation anatomo-fonctionnelle : exemple du cortex somatosensoriel primaire | 15 |
| 2.1. La colonne fonctionnelle | 15 |
| 2.2. La connectivité intracorticale | 16 |
| 2.2.1. Connectivité verticale..... | 16 |
| 2.2.2. Connectivité horizontale | 18 |
| 2.2.3. Connectivité inhibitrice | 21 |
| 2.3. Connectivité longue distance | 22 |
| 2.3.1. Connexions avec les aires corticales distantes | 22 |
| 2.3.2. Connexions avec le thalamus | 23 |
| 3. La fonction du S1 : exemple du cortex en tonneaux..... | 25 |
| 3.1. Description macroscopique de la matrice mystaciale..... | 26 |
| 3.2. Transduction du signal sensoriel | 26 |
| 3.2.1. De la vibrisse au cortex..... | 26 |
| 3.2.2. La voie canonique intracolonnaire | 27 |
| 3.2.3. Intégration et propagation horizontale | 29 |
| 3.3. Modulation de la réponse sensorielle par l'activité corticale | 30 |
| 3.3.1. Modulation liée à l'activité neuronale | 30 |
| 3.3.2. Modulation liée à l'activité de réseau | 31 |
| Les épilepsies | 33 |
| 1. Définition | 33 |
| 2. Classification | 34 |
| 3. Epilepsie-absence..... | 35 |
| 3.1. Généralités | 35 |
| 3.2. Etiologie..... | 35 |
| 3.3. Pronostic | 36 |
| 3.4. Traitements | 36 |
| 3.5. Comorbidités | 36 |
| 3.6. Modèles murins d'épilepsie-absence..... | 37 |
| 4. Le GAERS | 38 |
| 4.1. Origine et développement | 38 |
| 4.2. Caractéristiques EEG des crises..... | 38 |
| 4.3. Comportement..... | 39 |

| | | |
|---|--|------------|
| 4.4. | Traitements et développement thérapeutique | 39 |
| 5. | Origine des crises d'absence | 40 |
| 5.1. | Evolution des théories : entre cortex et thalamus et vice versa | 40 |
| 5.2. | Le foyer cortical | 42 |
| 5.3. | Le circuit de génération des crises dans le S1Bf | 43 |
| Objectifs de la thèse | | 46 |
| RESULTATS | | 48 |
| Article 1 | | 49 |
| Introduction | | 50 |
| Manuscrit | | 52 |
| Conclusion | | 97 |
| Article 2 | | 98 |
| Introduction | | 99 |
| Manuscrit | | 100 |
| Conclusion | | 116 |
| DISCUSSION GENERALE | | 117 |
| Epilepsie-absence : une question d'hyperconnectivité ? | | 119 |
| Coexistence d'un circuit physiologique et d'un circuit pathologique ? | | 121 |
| 1. | Rôles respectifs des deux circuits | 121 |
| 2. | Les neurones des couches 5/6 du GAERS: concilier physiologie et pathologie ? | 124 |
| Le système inhibiteur comme potentialisateur de l'activité épileptique ? | | 127 |
| Proposition d'un schéma intégré de l'initiation et de la propagation des DPO chez le GAERS | | 130 |
| ANNEXES | | 132 |
| Synchrotron X-ray microbeams: A promising tool for drug-resistant epilepsy treatment | | 133 |
| Building Up Absence Seizures in the Somatosensory Cortex: From Network to Cellular Epileptogenic Processes | | 141 |
| RÉFÉRENCES | | 159 |

Abréviations

| | |
|---------------------------|---|
| 5HT3aR | Récepteur 5-hydroxytryptamine de type 3a |
| CaV | Canaux calciques voltage dépendants |
| Cl | Clastrum |
| CSD | <i>Current source density analysis</i> |
| DPO | Décharges de pointes ondes |
| DTI | <i>Diffusion tensor imaging</i> |
| EA | Epilepsie absence |
| ECoG | Electrocorticogramme |
| Ect | Cortex ectorhinal |
| EEG | Electroencéphalogramme |
| EnvA | <i>Envelop protein from the avian ASLV type A</i> |
| GABA | Acide γ -aminobutyrique |
| GABA_{A,B} | Récepteurs GABAergiques A et B |
| GAERS | <i>Genetic absence epilepsy rat from Strasbourg</i> |
| GLUT | Transporteur au glutamate |
| ILAE | Ligue internationale contre l'épilepsie |
| IRMf | Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle |
| LFP | Potentiels de champs locaux |
| M1 | Cortex moteur primaire |

| | |
|----------------|---|
| M2 | Cortex moteur secondaire |
| Mo | Cortex moteur |
| MRT | <i>Microbeam radiation therapy</i> |
| MUA | Activité multi-unitaire |
| NEC | <i>Non epileptic control</i> |
| nRT | Noyau réticulé du thalamus |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| PA | Potentiel d'action |
| POm | Noyau Postéro median du thalamus |
| PTZ | Pentilentetrazol |
| PV | Parvalbumine |
| RABV | <i>Rabies virus</i> |
| S1 | Cortex somatosensoriel primaire |
| S2 | Cortex somatosensoriel secondaire |
| S1Bf | Cortex S1 à tonneaux (ang., barrel field) |
| SEP | Potentiel évoqué somatosensoriel |
| SST | Somatostatine |
| TC | Cellules thalamo-corticales |
| TVA | <i>Receptor of the avian ASLV type A</i> |
| VIP | Peptide vasoactif intestinal |
| VPM | Noyau ventropostéro median du thalamus |
| WAG/Rij | <i>Wistar albino glaxo from Rijswijk</i> |

Liste des figures et tableaux :

- Figure 1** Organisation anatomique du cortex
- Figure 2** Organisation des différents types de cellules gliales
- Figure 3** Caractéristique morpho-anatomique des neurones excitateurs corticaux
- Figure 4** Caractéristique morpho-anatomique des interneurons corticaux
- Figure 5** Organisation anatomo-fonctionnelle du cortex somatosensoriel primaire chez le rongeur
- Figure 6** Connectivité verticale des neurones glutamatergiques corticaux
- Figure 7** Connectivité horizontale des neurones glutamatergiques corticaux
- Figure 8** Connectivité des interneurons GABAergiques corticaux
- Figure 9** Connectivité longue distance des neurones du cortex somatosensoriel primaire
- Figure 10** Des vibrisses au cortex en tonneaux
- Figure 11** Schéma des voies lemniscale et paralemniscale
- Figure 12** Propagation horizontale de l'information après stimulation d'une vibrisse
- Figure 13** Modulation de la réponse sensorielle évoquée
- Tableau 1** Classification des crises d'épilepsie

| | |
|------------------|--|
| Tableau 2 | Classification des syndromes épileptiques |
| Figure 14 | Décharge de pointes-ondes chez l'Homme |
| Figure 15 | Décharge de pointes-ondes chez le GAERS |
| Figure 16 | Théories du site d'initiation des crises d'absence |
| Figure 17 | Théorie thalamique de génération des crises d'absences |
| Figure 18 | Initiation corticale des décharges de pointes-ondes chez le GAERS |
| Figure 19 | Rôle des neurones des couches profondes dans l'initiation des DPO |
| Figure 20 | Schéma intégré du circuit d'initiation et de propagation des DPO chez le GAERS |

Avant-propos

Le cerveau est un organe essentiel qui permet les contrôles moteurs, sensoriels et cognitifs de notre corps. Son organisation est hautement hiérarchisée et on peut notamment distinguer différentes régions qui sont spécialisées dans une fonction bien précise. En particulier, le néocortex, partie la plus externe du cerveau, présente des aires spécialisées dans l'intégration des stimuli auditifs, visuels ou encore somatosensoriels. Cette dernière classe d'information est traitée au sein du cortex somatosensoriel primaire (S1) qui possède une organisation complexe, précise et stéréotypée où les informations provenant de différentes parties du corps sont traitées par des aires particulières (Penfield and Jasper, 1954). Chez le rat, une des informations sensorielles la plus importante est celle des vibrisses qui est traitée par la région du cortex S1 appelé cortex en tonneau ou *barrel field* (S1Bf). Les vibrisses permettent notamment aux rongeurs de percevoir leur environnement immédiat (Kleinfeld et al., 2006; Petersen, 2007; Feldmeyer et al., 2013) grâce à un codage fin de l'amplitude et de la vitesse de leur déflexion au sein du S1Bf, permettant ainsi une analyse du type de surface rencontrée par les animaux (Bruno et al., 2003; Kremer et al., 2011; Estebanez et al., 2016; Kerekes et al., 2017).

Le cortex, afin d'assurer ses différentes fonctions, présente une organisation particulièrement stéréotypée où les neurones qui le composent s'organisent en réseaux spécialisés, définis par le fait qu'ils partagent une activité commune ou une sélectivité à un même stimulus (Mountcastle, 1957; Silberberg et al., 2005). Au sein de ces réseaux, les neurones excitateurs et inhibiteurs s'organisent en microcircuits fonctionnels grâce à des connexions inter-neuronales (Harris and Shepherd, 2015; Paz and Huguenard, 2015) qui permettent la modulation de la réponse des réseaux (Silberberg et al., 2005; Harris and Mrsic-Flogel, 2013; Isaacson and Scanziani, 2011). La mise en place de ces connexions se fait progressivement au cours de la maturation corticale sous l'influence de facteurs génétiques mais également de leur propre activité et de celle induite par l'environnement (Ben-Ari, 2008; Rakic et al., 2009). Ce sont donc les connexions qui composent les microcircuits qui assurent la fonction des structures corticales (Harris and Mrsic-Flogel, 2013). Le dysfonctionnement de

ces connexions peut conduire à des pathologies neurologiques dont l'épilepsie est sans doute l'une des meilleures illustrations.

L'épilepsie est une des pathologies neurologiques les plus fréquentes. Elle est considérée comme une maladie de réseau car les crises sont générées par des ensembles complexes de neurones qui se synchronisent de façon pathologique lors de la survenue d'une crise (Uhlhaas and Singer, 2006). La question du lien entre la génération des crises et des anomalies de la connectivité au sein d'un réseau de neurones est aujourd'hui centrale en épileptologie. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence des anomalies de connectivité dans des modèles animaux d'épilepsie (Epsztein et al., 2005; Feldt Muldoon et al., 2013; Althaus et al., 2016) ainsi que chez l'Homme (Yan and Li, 2013). A ce titre, l'épilepsie-absence de l'enfant (EAE) est une des formes les plus courante qui se développe au cours de la maturation cérébrale (Loiseau et al., 1995; Garzon et al., 2016). L'EAE est un syndrome épileptique caractérisé par des crises généralisées non-convulsives (Berg et al., 2010) associées à des décharges de pointes-ondes (DPO) bilatérales et synchrones et une altération concomitante de la conscience et du contact avec l'environnement (Loiseau et al., 1995; Garzon et al., 2016). Les DPO sont initiées au niveau du cortex comme le montrent de nombreuses études chez l'Homme (Holmes et al., 2004; Le Van Quyen et al., 2006; Tucker et al., 2007; Bai et al., 2010) et chez l'animal (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007, 2009a; Pouyatos et al., 2013). Cependant, notre connaissance actuelle sur les défauts de connectivité qui pourraient être associés à la génération des DPO reste encore très sommaire.

Plusieurs modèles animaux ont été décrits qui permettent d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes pathologiques mis en jeu lors de la mise en place du réseau épileptique et de la génération des crises (Jarre et al., 2017a). Au laboratoire, nous disposons d'un modèle génétique d'EAE chez le rat, le *Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg* (GAERS). Le GAERS présente un grand isomorphisme et une excellente prédictivité pharmacologique par rapport à la pathologie humaine (Depaulis et al., 2016) ce qui en fait un modèle robuste pour l'étude des mécanismes et des circuits qui mènent à la génération des DPO. Il a notamment été montré que chez le GAERS les crises sont initiées dans le S1Bf par les neurones des couches infragranulaires (Polack et al., 2007; David et al., 2008; Polack et al., 2009; Pouyatos et al., 2013) et que ces neurones présentent des caractéristiques d'excitabilité différentes des rats non-épileptiques (Polack et al., 2007; Chipaux et al., 2011;

Williams et al., 2016) qui se mettent en place progressivement pendant le développement des DPO (Jarre et al., 2017b). L'ensemble de ces résultats a conduit à suggérer l'existence d'un circuit de génération des DPO au sein du S1Bf où l'activité paroxystique se propagerait des couches infragranulaires aux autres couches du S1Bf, puis aux noyaux relais du thalamus et aux autres aires corticales (Polack et al., 2007; Depaulis and Charpier, 2017). Cependant, à ce jour aucune étude n'a pu mettre en évidence un défaut de connectivité au sein du S1Bf des GAERS qui pourrait expliquer l'existence de ce circuit.

La première partie de l'introduction sera consacrée au cortex. Nous présenterons dans un premier temps son organisation anatomique et plus particulièrement la composition et l'organisation structurelle des neurones excitateurs et inhibiteurs corticaux. Nous verrons ensuite comment ces neurones s'organisent en réseaux fonctionnels en prenant l'exemple du cortex S1. Nous décrirons ainsi l'état actuel des connaissances concernant les connexions qui existent entre les neurones, qu'ils soient excitateurs ou inhibiteurs. Ensuite, nous verrons comment ces réseaux permettent de transmettre et de moduler le signal sensoriel, en prenant l'exemple du S1Bf et l'information codée par les vibrisses chez le rongeur. La deuxième partie de l'introduction portera sur les épilepsies. Une attention particulière sera portée à l'épilepsie-absence et à ses caractéristiques cliniques. Nous détaillerons ensuite le modèle du GAERS (origine, propriétés électrophysiologiques, comportement) avant de décrire l'évolution des différentes théories de l'origine des DPO.

La partie résultats de cette thèse est présentée sous la forme de manuscrits destinés à être soumis à publication prochainement. Dans la première étude originale, nous avons étudié par des méthodes de traçage synaptique et d'électrophysiologie extracellulaire le réseau d'initiation des DPO chez le GAERS. Nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'une connectivité anormale au sein du cortex S1Bf qui participe à la génération et à l'amplification des DPO. Nous avons ensuite utilisé le rayon-x synchrotron pour étudier les conséquences d'une altération de cette connectivité. La deuxième étude vise à comprendre si la connectivité anormale du S1Bf chez le GAERS interfère avec la fonction de cette structure, à savoir le traitement de l'information sensorielle des vibrisses. Pour cela, nous avons comparé les réponses électrophysiologiques évoquées par des stimuli des vibrisses ainsi que la capacité de discrimination de texture des GAERS, par comparaison avec des rats Wistar. Cette étude est en cours de finalisation et sera soumise à publication.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, j'ai souhaité discuter l'existence d'une connectivité anormale dans le S1Bf du GAERS et son rôle dans l'hypersynchronisation associée à la génération des DPO. Nous discuterons ensuite de l'intérêt de l'existence de deux circuits neuronaux au sein du S1Bf chez le GAERS : (i) un circuit physiologique qui permet le traitement de l'information sensorielle et (ii) un circuit pathologique impliqué dans l'initiation des DPO, ainsi que du rôle des neurones excitateurs et inhibiteurs au sein de ces circuits. Cela nous permettra de proposer un nouveau circuit de génération et de propagation des DPO au sein du S1Bf chez le GAERS.

Introduction

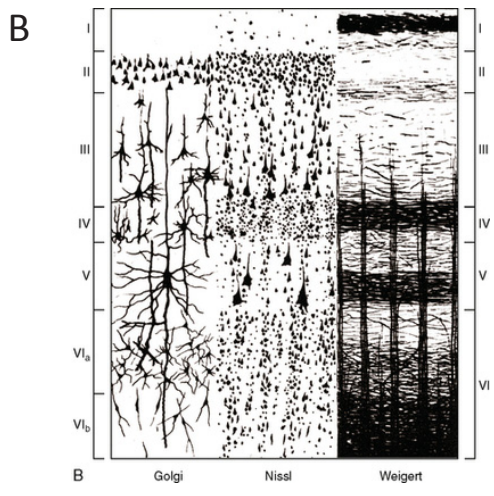
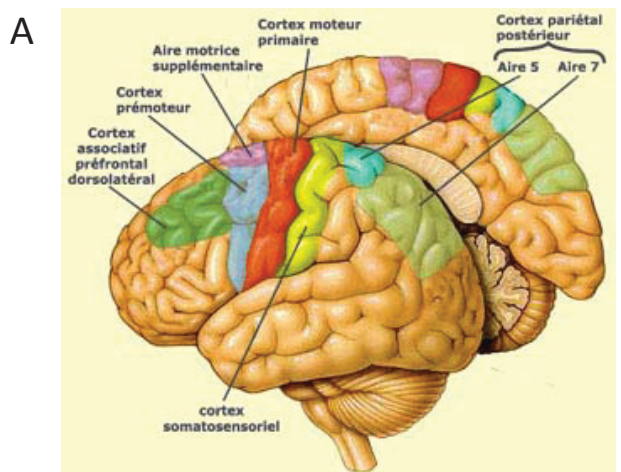


Figure 1: Organisation anatomique du cortex. (A) Représentation des différentes aire corticales chez l'Homme. (B) Organisation laminaire du cortex: mise en évidence des couches corticales grâce à 3 type de marquages cytologiques.

Le cortex

Le néocortex est la partie la plus externe du cerveau. Il peut être segmenté en territoires fonctionnels, ou aires corticales, déterminés par leurs fonctions spécifiques (Figure 1). Ce sont ces aires corticales qui permettent la réception, le traitement et l'intégration des informations de la périphérie et notamment les informations sensorielles, motrices et cognitives. Une des particularités du néocortex est d'être constitué de 6 couches cellulaires (en anglais layer, L) parallèles à la surface du cerveau ; la couche 1 étant la plus externe et la 6 la plus interne (Figure 1). Ces couches sont différenciées par le type et la densité des cellules qui les composent. Ainsi, la couche 4 est la plus densément peuplée ce qui permet de la distinguer des couches plus superficielles (L2/3) ainsi que des couches plus profondes (L5/6) (Figure 1).

1. Composition cellulaire

Le cerveau est constitué de deux grands types cellulaires : les cellules gliales et les neurones. La principale différence entre ces deux catégories de cellules est que seuls les neurones sont capables de générer et de transmettre une activité électrique. Néanmoins, les neurones et les cellules gliales travaillent de concert afin de générer et de maintenir le bon fonctionnement du cerveau. Dans la partie qui suit seront décrites rapidement les cellules gliales et plus extensivement les neurones car lors de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé au réseau formé par ce deuxième type cellulaire.

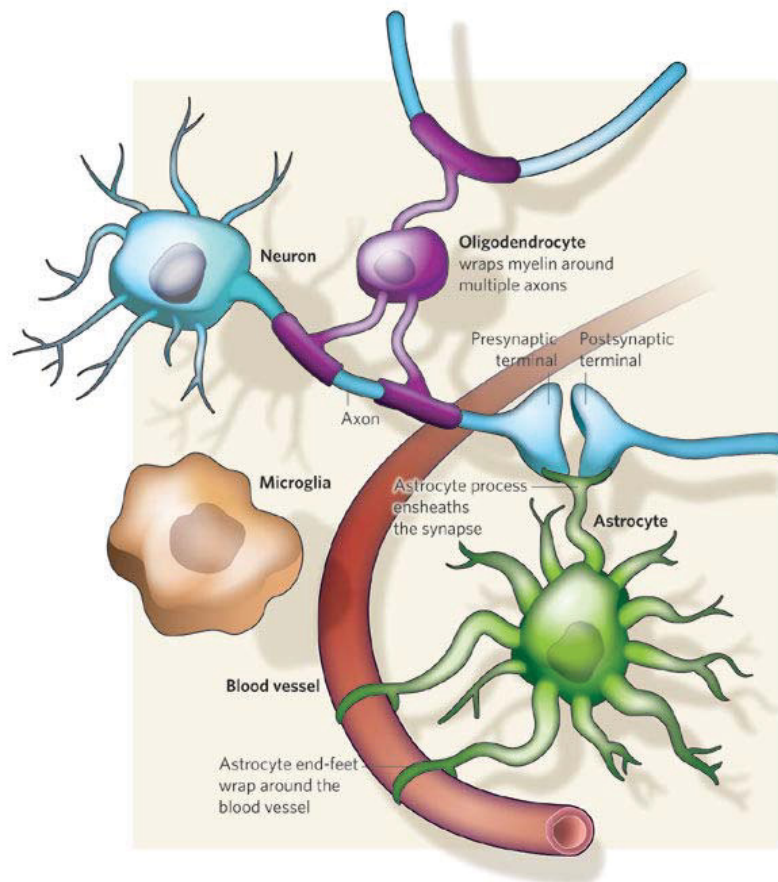


Figure 2: Organisation des différents types de cellules gliales. En vert, l'astrocyte est d'une part en contact avec le système sanguin et d'autre part il englobe les boutons pré- et post-synaptiques afin de cloisonner la fente synaptique. En violet, l'oligodendrocyte enrôle une partie de sa membrane riche en myéline autour des axones des neurones à proximité. En marron, la microglie veille à l'intégrité du tissu cérébrale. (Allen and Barres, 2009).

1.1. Les cellules gliales

Les cellules gliales représentent près de 65% des cellules du cerveau chez le rongeur (Allen and Barres, 2009). On en dénombre trois grands types au niveau cortical qui se distinguent par leur rôle, leur morphologie et leur fonctionnement : (i) les oligodendrocytes, (ii) les astrocytes et (iii) les microglies.

Les **oligodendrocytes** dérivent du neurectoderme et ont ainsi la même origine embryologique que les neurones. Ces cellules favorisent la transmission nerveuse et plus particulièrement la vitesse de conduction le long des axones. En effet, leur principale caractéristique est de produire une membrane lipidique : la myéline (Dimou and Simons, 2017). Cette myéline va entourer les axones et créer ainsi une couche isolante qui permet d'augmenter la vitesse de conduction neuronale et que l'on nomme « gaine de myéline » (Figure 2). En ce sens les oligodendrocytes augmentent l'efficacité de la communication entre les neurones.

Les **astrocytes**, comme les oligodendrocytes, dérivent du neurectoderme. Ces cellules sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins et les neurones (Allen and Barres, 2009). Ils vont ainsi pouvoir réguler le débit sanguin si une activité cérébrale importante nécessite l'apport de nutriments et d'énergie supplémentaire (Figure 2). Ils vont ensuite transmettre aux neurones les éléments ainsi récoltés dans la circulation sanguine. D'autre part, les astrocytes régulent l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire. Enfin, ils jouent un rôle essentiel au niveau synaptique. En effet, les astrocytes vont entourer les éléments pré- et post-synaptiques neuronaux afin d'isoler la fente synaptique du reste du milieu extracellulaire et former ainsi la synapse tripartite (Perea et al., 2009) (Figure 2). Par ce mécanisme, ils modulent activement la transmission synaptique notamment par recapture des neurotransmetteurs. Au-delà de ces contacts astrocytes-neurones, les astrocytes sont organisés en un réseau dense où les contacts et échanges entre deux astrocytes se font via les gap-jonctions (Giaume, 2010) mais également par sécrétion de gliotransmetteurs tels que l'ATP, la D-sérine ou le glutamate qui leur permettent de communiquer entre eux mais également avec les neurones (Bezzi and Volterra, 2001; Araque et al., 2014). Ainsi, les astrocytes représentent un partenaire privilégié des neurones en favorisant leur communication et en maintenant leur apport énergétique.

La **microglie**, contrairement aux deux classes précédentes, ne dérive pas du neurectoderme mais du système immunitaire (origine hématopoïétique). Elle joue le rôle de cellule immunitaire du cerveau (Figure 2). Ces cellules vont notamment phagocyter les débris cellulaires lors d'atteintes cérébrales ou d'infections (Allen and Barres, 2009). Elles sont aussi impliquées dans de nombreuses pathologies ainsi que dans la mise en place et la régulation des réseaux neuronaux (Wake et al., 2013). Les cellules microgliales jouent ainsi un rôle important dans le maintien de l'intégrité du tissu cérébral.

Ainsi, bien que l'on ait longtemps cru que les cellules gliales ne servaient que de « glue » soit de tissu extracellulaire servant au maintien du réseau neuronal, on sait aujourd'hui qu'elles jouent un rôle actif au sein du tissu cérébral et permettent le bon fonctionnement et la régulation de l'activité des neurones.

1.2. Les neurones

Deux grandes classes de neurones sont présentes dans le cortex cérébral: (i) les neurones excitateurs qui sont glutamatergiques et épineux et qui représentent environ 80% des neurones du cortex et (ii) les interneurones inhibiteurs qui sont GABAergiques et qui représentent les 20% restant (Markram et al., 2004; Harris and Shepherd, 2015). Ces deux types cellulaires n'ont pas la même origine. Les neurones excitateurs sont issus de progéniteurs neuroblastiques qui proviennent de la zone ventriculaire et de la glie radiaire par l'intermédiaire de laquelle ils envahissent le cortex entre le 11^{ème} et le 16^{ème} jour embryonnaire (Greig et al., 2013). Les interneurones proviennent de progéniteurs issus de l'éminence ganglionnaire et qui migrent de manière tangentielle pour envahir le cortex entre le 10^{ème} et le 18^{ème} jour embryonnaire (Wonders and Anderson, 2006). Ainsi, chez le rongeur, les neurones sont en place au niveau cortical avant même la naissance de l'animal. Dans les deux prochains paragraphes sont décrites les propriétés morphologiques et la répartition laminaire de ces deux types de neurones corticaux.

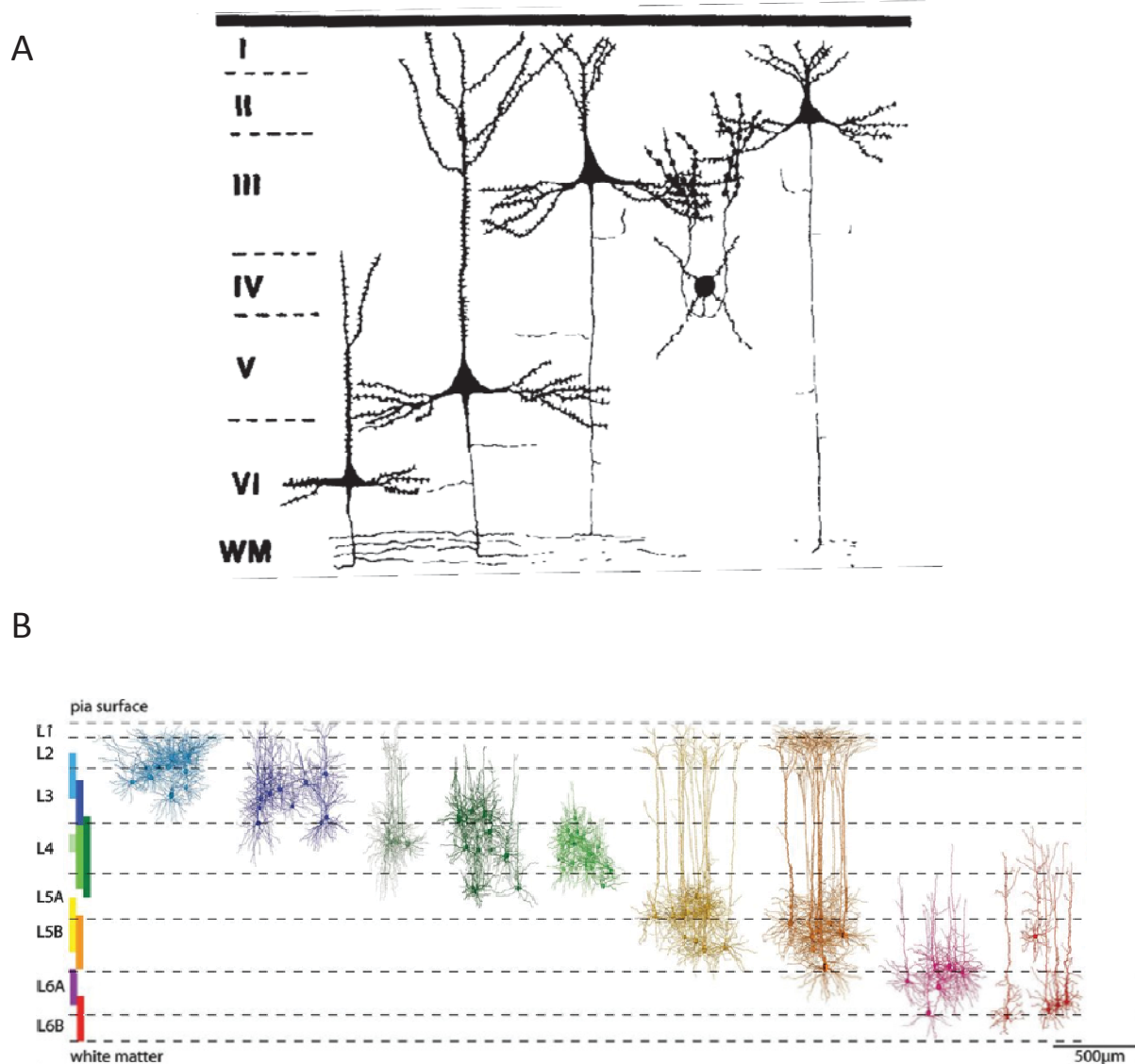


Figure 3: Caractéristique morfo-anatomique des neurones excitateurs corticaux. (A) Les neurones excitateurs sont pyramidaux dans toutes les couches sauf en L4 où ils adoptent une morphologie étoilée; (B) Les différents types de neurones excitateurs en fonction des couches corticales et leurs arborisations dendritiques (adaptés de DeFelipe et al. 2010 et Oberlaender et al. 2012).

1.2.1. Les neurones excitateurs

Les neurones excitateurs du cortex expriment et sécrètent majoritairement le glutamate. Ils sont également qualifiés de neurones de projection car ils émettent un axone long en direction de cellules cibles plus ou moins distantes. Ces projections sont décrites plus en détail dans une prochaine section. Les neurones excitateurs sont caractérisés par un corps cellulaire pyramidal dont partent latéralement deux dendrites basales et verticalement une dendrite apicale. Ces caractéristiques sont vraies dans toutes les couches à l'exception de la couche 4 (couche granulaire) où les neurones glutamatergiques sont majoritairement étoilés bien que l'on y trouve également de petites pyramides (Figure 3). Ces cellules étoilées présentent un corps cellulaire ovoïde associé à une arborisation dendritique très locale. Elles sont ainsi également qualifiées d'interneurones excitateurs par opposition aux cellules pyramidales qui, pour la couche 4, vont majoritairement envoyer leurs dendrites en L3 (Feldmeyer et al., 1999; Schubert et al., 2003; Staiger et al., 2004) (Figure 3). Les neurones pyramidaux des couches 2/3 (couche supragranulaire) sont de petite taille et présentent une arborisation dendritique apicale qui se ramifie en L2/3 et en L1 et des dendrites basales qui restent en L2/3 (Figure 3). Les neurones pyramidaux des couches 5 et 6 (couche infragranulaire) ont quant à eux des corps cellulaires plus grands et des dendrites apicales qui se projettent en L2/3 et L1 (neurones de L5) ou en couche 5 (neurones de L6) (DeFelipe and Fariñas, 1992; Oberlaender et al., 2012; Harris and Shepherd, 2015) (Figure 3). En couche 5, on peut notamment distinguer deux sortes de cellules pyramidales en fonction de leur mode de décharge et de la morphologie de leur arborisation dendritique : (i) les neurones avec dendrites faiblement arborisées et qui ont une activité régulière (ang. *Slender tufted and regular spiking*) et (ii) les neurones qui ont une arborisation dendritique plus complexe et qui déchargent en bouffée de potentiels d'action (ang. *Thick tufted and intrinsically bursting*) (Jacob et al., 2012; Staiger et al., 2016).

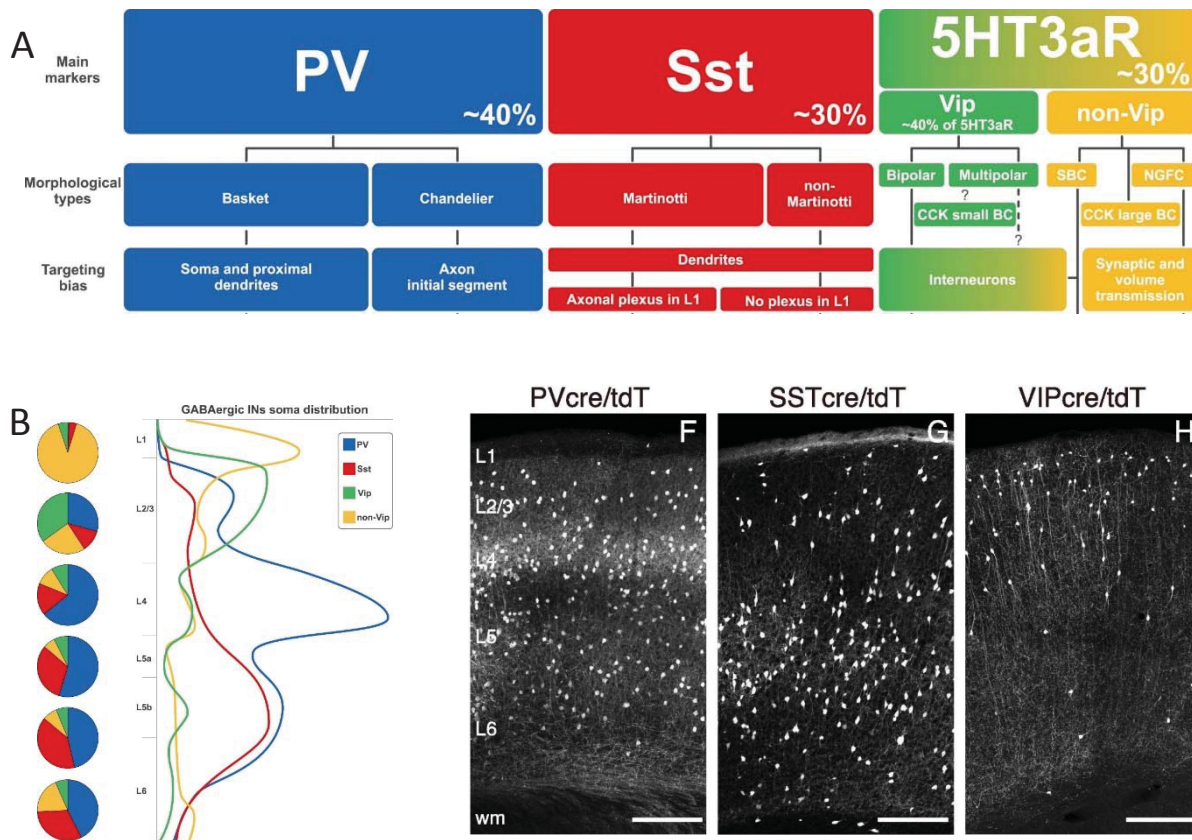


Figure 4: Caractéristique morpho-anatomique des interneurons corticaux. (A) Distinction entre 3 classes d'interneurons. (B) Répartition des interneurons entre les couches corticales. (adaptés de Tremblay et al. 2016 et Feldmeyer et al. 2017).

1.2.2. Les neurones inhibiteurs

Les interneurones inhibiteurs sont des cellules non pyramidales, comportant peu ou pas d'épines dendritiques, qui expriment et sécrètent le GABA (acide γ -aminobutyrique). Ils sont appelés interneurones ou neurones locaux car, de manière générale, ils présentent un axone court favorisant les contacts avec les neurones à proximité. Plusieurs classifications de ces neurones existent basées sur leur mode de décharge, leur expression neurochimique ou encore leur morphologie (Ascoli et al., 2008). Sur la base neurochimique, on peut distinguer trois classes d'interneurones selon qu'ils expriment : (i) la Parvalbumine (PV), (ii) la Somatostatine (SST) ou (iii) les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{3a} dont font partie les interneurones qui expriment le Peptide Vasoactif Intestinal (VIP) (Markram et al., 2004; Harris and Mrsic-Flogel, 2013; Tremblay et al., 2016) (Figure 4). Les interneurones PV+ sont présents dans les couches 2/3 à 6 mais tout particulièrement au niveau L4 (Figure 4). Ils ciblent soit le soma et les dendrites proximales (cellules en panier, ang. *Basket cells*) soit le segment initial (cellules en chandelier) et peuvent ainsi moduler l'activité et la sortie d'information ou *output* des cellules pyramidales. Les interneurones SST+ (cellule de Martinotti) sont présents majoritairement en L5/6 même si on les retrouve également dans les autres couches (Figure 4). Ces cellules contactent les dendrites distales des neurones pyramidaux et modulent grâce à cela leur intégration synaptique. Les interneurones VIP+ sont majoritairement exprimés en L2/3 et contactent les interneurones SST+ modulant ainsi leur activité (Figure 4). D'un point de vue électrophysiologique, on peut distinguer les interneurones en fonction de leur type de décharge et ainsi distinguer les interneurones à décharge rapide (*Fast-spiking*), ceux qui ont un seuil de décharge bas (*Low threshold spiking*), ceux qui ont une décharge régulière (*Regular spiking*) et enfin ceux qui présentent une décharge retardée (*Late spiking*).

Ainsi les neurones excitateurs et inhibiteurs du cortex sont les générateurs et les effecteurs de l'activité cérébrale. Ils communiquent et sont interconnectés formant ainsi des microcircuits qui sont à la base de l'activité corticale. Les connexions inter-neurales qui composent ces circuits sont décrites plus en détail dans un prochain paragraphe.

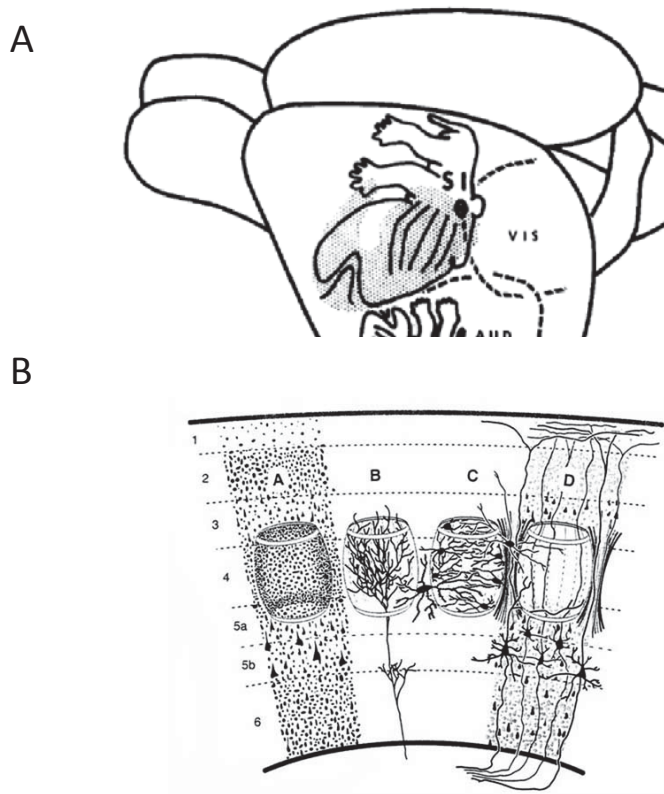


Figure 5: Organisation anatomo-fonctionnelle du cortex somatosensoriel primaire chez le rongeur. (A) Ratonculus: représentation des zones corporelles au niveau du cortex S1; les vibrisses occupent la plus grande surface. (B) Les colonnes du cortex somatosensoriel primaire S1Bf sont caractérisées par la présence de tonneaux en couche 4. (adaptés de Woolsey and Van der Loos, 1970 et White and Peters, 1995)

2. Organisation anatomo-fonctionnelle : exemple du cortex somatosensoriel primaire

Le cortex somatosensoriel primaire (S1) traite les informations liées à la perception du toucher, également appelé information somesthésique. Le S1 présente une somatotopie fine qui permet de représenter au niveau cortical chaque partie du corps de façon proportionnelle à la sensorialité comme le décrit l'homonculus chez l'homme ou le ratonculus chez le rat (Figure 5). Chez les rongeurs, c'est l'aire qui code pour les informations provenant des vibrisses qui est la plus étendue, ce qui est cohérent avec l'importance de cet organe sensoriel pour les rongeurs. Afin d'assurer ces fonctions, les neurones excitateurs et inhibiteurs du cortex s'organisent en réseaux ou circuits qui permettent notamment de définir des unités fonctionnelles.

2.1. La colonne fonctionnelle

En plus de l'organisation laminaire que l'on a vue précédemment, les neurones corticaux s'organisent de manière perpendiculaire à la surface du cerveau en unités fonctionnelles nommées colonnes corticales (Figure 5). Décrites dès les années 60, les colonnes sont ainsi formées par des neurones qui répondent sélectivement à un même stimulus (Mountcastle, 1957; Woolsey and Van der Loos, 1970). Ce niveau d'organisation a largement été étudié dans la partie du cortex S1 qui code pour les vibrisses : le cortex S1Bf (cortex S1 partie des tonneaux ou *barrel field* en anglais) où chaque tonneau correspond à une colonne corticale qui code l'information d'une vibrisse donnée (Figure 5). Ainsi l'ensemble des tonneaux représentent l'ensemble des vibrisses.

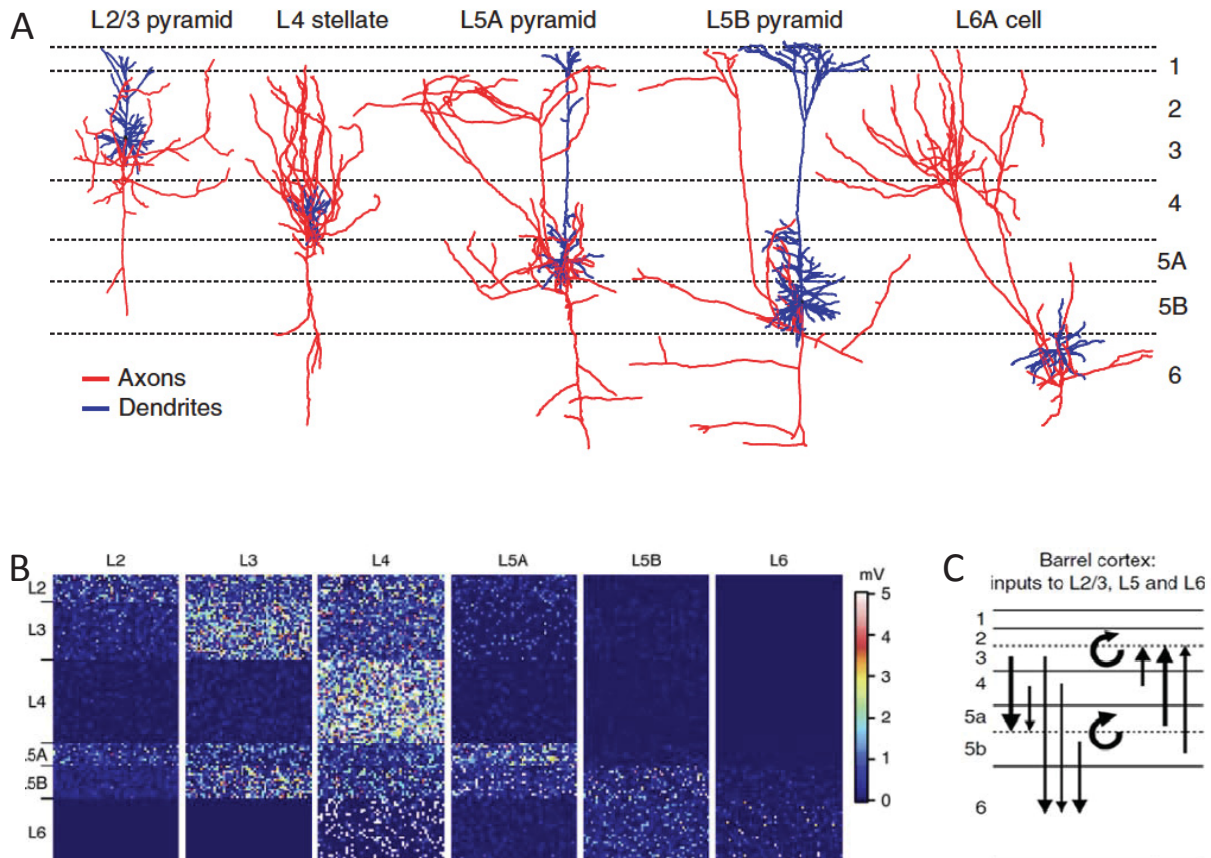


Figure 6: Connectivité des neurones glutamatergiques corticaux. (A) Arborisation axonale (rouge) et dendritique (bleu) des formes typiques de cellules excitatrices. (B) Connectivité fonctionnelle au sein de la colonne corticale C2: réponses évoquées moyennes après stimulation d'un neurone excitateur (code couleur: potentiel post-synaptique excitateur évoqué). (C) Schéma résumant la connectivité des neurones excitateurs déterminée par traçage synaptique rétrograde. (adaptés de Schepherd et al. 2005, Lefort et al. 2009 et DeNardo et al. 2015).

2.2. La connectivité intracorticale

La connectivité au sein du néocortex a été étudiée d'un point de vue structurel et fonctionnel. Structurellement, ces connexions ont été visualisées grâce à l'utilisation de traceurs synaptiques, de marquages mono-cellulaires révélant les arborisations dendritiques et axonales (Pinault, 1996; Veinante et al., 2000) ou encore, plus récemment, à l'aide de traceurs monosynaptiques rétrogrades tel que le *Rabies virus* (Wickersham et al., 2007). La connectivité fonctionnelle a essentiellement été étudiée en patch-clamp multi-pipette en enregistrant simultanément des neurones de plusieurs couches corticales, par décageage de glutamate et *Laser Scanning Photostimulation*, par imagerie calcique ou encore à l'aide d'électrodes extracellulaires multi-site en silicone (ang. *silicon probes*) (Schubert et al., 2007; Lefort et al., 2009; Kandel and Buzsáki, 1997; Feldt Muldoon et al., 2013).

2.2.1. Connectivité verticale

La connectivité au sein de la colonne corticale, dite connectivité verticale, a été étudiée *in vitro* sur tranche en particulier au sein du cortex S1Bf. En effet, les chercheurs prennent avantage de la possibilité de visualiser les tonneaux en lumière transmise afin de délimiter spatialement la colonne et ainsi s'orienter et se guider (Shepherd and Svoboda, 2005). La majorité des connexions du néocortex sont locales et intralaminaires (Lübke and Feldmeyer, 2007). Elles sont favorisées par le recouvrement des arborisations axonales des neurones pré-synaptiques et dendritiques des neurones post-synaptiques. Ces connexions sont déterminées lors du développement (Bureau et al., 2004; Shepherd et al., 2005) (Figure 6).

Les neurones pyramidaux des couches 2/3 sont principalement connectés avec les neurones de la même couche (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015) où ils forment des micro-réseaux locaux (Kampa et al., 2006) (Figure 6). Ils sont également, dans une proportion plus faible, connectés aux neurones pyramidaux de la couche 5 (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015; Beltramo et al., 2013). Deux neurones pyramidaux des couches 2/3 qui sont interconnectés, et participent ainsi au même micro-réseau, ne vont pas être connectés au

même neurone de L5 (Kampa et al., 2006) évitant ainsi la redondance de connexion. Cette connexion L2/3→L5 permettrait une propagation de l'information des couches superficielles vers les couches profondes qui à leur tour propageraient l'information entre les colonnes par l'intermédiaire de connexions horizontales (Adesnik and Scanziani, 2010).

Les neurones de la couche 4 sont principalement connectés entre eux, au sein d'un même tonneau (Feldmeyer et al., 1999; Petersen and Sakmann, 2000). La probabilité de connexions entre deux neurones de L4 est en effet estimée à 24,3% alors que pour les autres couches elle est de 10,8% en moyenne (Lefort et al., 2009). Ainsi, les neurones étoilés restent confinés et se connectent principalement avec les neurones de la même couche (Feldmeyer et al., 1999; Schubert et al., 2003; Staiger et al., 2004) (Figure 6). Néanmoins, certains neurones des L4 projettent leur axone également en direction des neurones des couches 2/3 (Bureau et al., 2004; Shepherd et al., 2005; Lefort et al., 2009), c'est tout particulièrement le cas des petites cellules pyramidales (Feldmeyer et al., 1999). On retrouve aussi une connexion L4→L5A de la même colonne fonctionnelle qui permet de faire le lien entre la voie lemniscale et paralemniscale (voir ci-après) (Feldmeyer et al., 2005). Enfin, il est important de noter que ces neurones de L4 reçoivent très peu de connexions des autres couches corticales.

Les neurones de la couche 5 sont eux aussi majoritairement connectés avec les neurones de la même couche (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015) (Figure 6). Ainsi, pour les neurones de la couche 5A, chez le jeune rat, il est estimé qu'une cellule pyramidale contacte 270 de ces homologues de la même couche, participant ainsi à un circuit d'excitation linéaire de proche en proche ou *feedforward excitation* par l'intermédiaire des entrées excitatrices reçues de L4 (Frick et al., 2008). Ces neurones de L5A contactent les neurones des couches 2/3 (Shepherd et al., 2005). Il est ainsi possible d'enregistrer en L2/3 des élévations de potentiel de membrane suite à une activation des neurones de L5 (Beltramo et al., 2013). Les neurones des couches 5B participent quant à eux d'avantage à des voies de sortie et de projection vers d'autres aires corticales ou sous-corticales (Frick et al., 2008; Kampa et al., 2006). Ils sont interconnectés entre eux pour former des micro-réseaux locaux qui sont en moyenne constitués de 12 neurones avec une distance inter-soma d'environ 100µm (Perin et al., 2011). Parallèlement à cette connexion intralaminare locale, les neurones de L5b projettent, au sein de la même colonne corticale, sur les cellules de la couche L6 (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015). Ces connexions intracolonnaires sont principalement médiées

par les neurones pyramidaux qui présentent la plus faible arborisation dendritique (ang. *slender tufted*) (Jacob et al., 2012; Staiger et al., 2016).

Les neurones de la couche 6 sont connectés entre eux et dans une moindre mesure aux neurones de la couche 5 de la même colonne corticale (DeNardo et al., 2015). Plus précisément, ces neurones contactent les neurones de L5B mais pas ceux de L5A (Lefort et al., 2009). La connectivité intracolonnaire des neurones de L6 est faible ce qui est cohérent avec le fait que cette couche est essentiellement impliquée dans le transfert de l'information de manière horizontale entre les colonnes corticales ainsi que du cortex aux structures sous-corticales (voir ci-dessous) (Schnepel et al., 2015; Veinante et al., 2000).

En résumé, les neurones excitateurs, au sein de la colonne corticale, émettent majoritairement des projections intralaminaires puis, dans une moindre mesure, des projections interlaminaires c'est à dire entre les couches corticales. Ce deuxième type de projection est dominé, quelle que soit la couche, par une direction majoritaire qui dessine un circuit allant des neurones de la couche 4 vers ceux des couches 2/3 et finalement vers les neurones des couches 5/6. Ces connexions restent cantonnées dans une colonne fonctionnelle donnée et en dessinent les contours. La communication entre ces colonnes se fait grâce à des projections horizontales.

2.2.2. Connectivité horizontale

Moins étudiée que la connectivité verticale au sein du cortex somatosensoriel, la connectivité dite horizontale, encore appelée connectivité transcolonnaire, désigne les connexions excitatrices qui se font entre deux neurones n'appartenant pas à la même colonne fonctionnelle (Gilbert and Wiesel, 1983). Les axones de ces neurones cheminent entre les colonnes corticales, de manière médio-latérale ou antéro-postérieure au sein du cortex et non pas par l'intermédiaire du corps calleux. Notamment décrites dans les cortex sensoriels, ces connexions horizontales jouent un rôle important dans les processus d'intégration de l'information reçue (Boucsein, 2011). Au sein du cortex somatosensoriel, les connexions

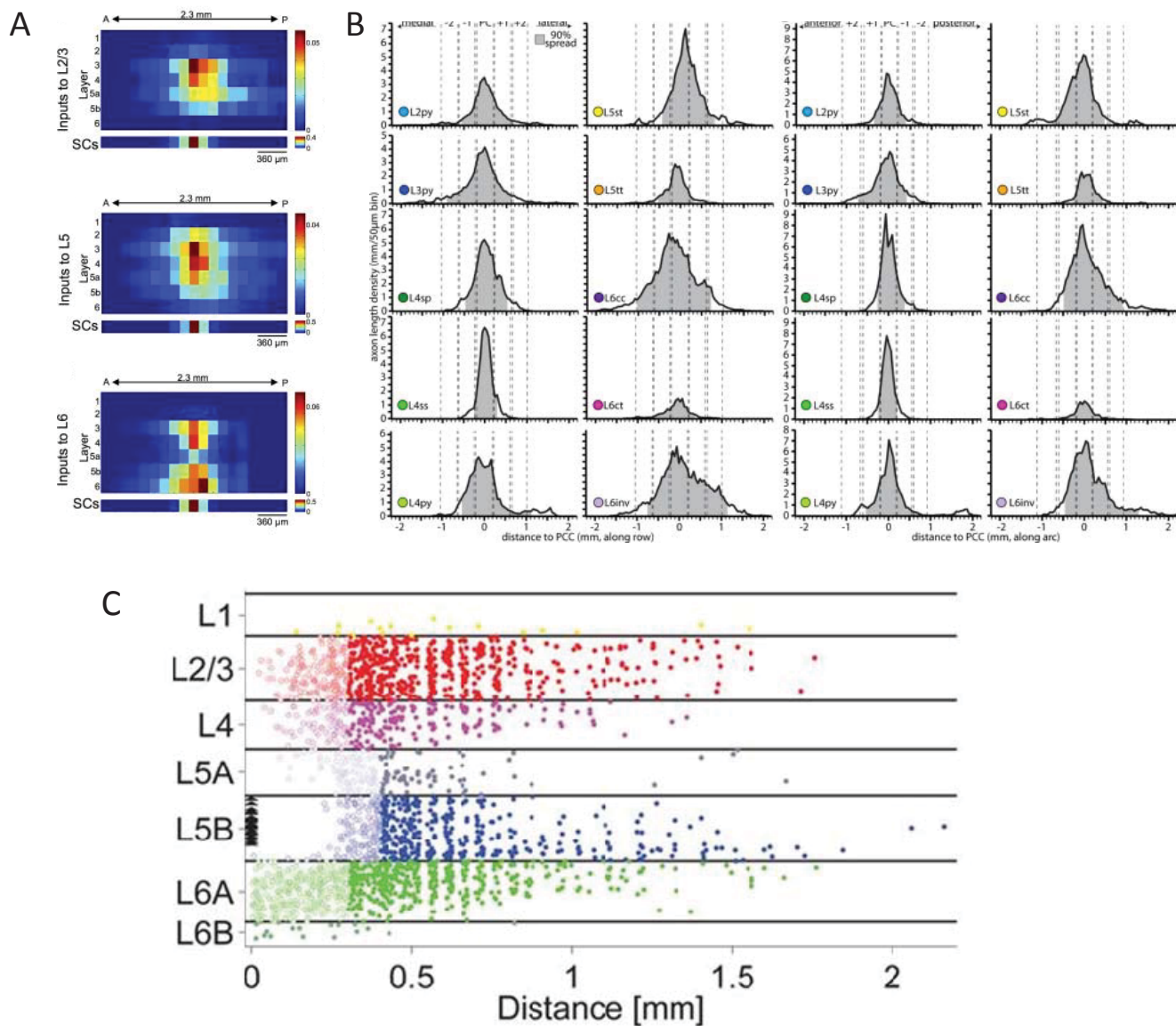


Figure 7: Connectivité excitatrice horizontale. (A) Détermination de la connectivité horizontale par traçage rétrograde monosynaptique. (B) Profil de distribution des axones dans l'axe des colonnes (gauche) et dans celui des arcs (droite) pour les différents types neuronaux des couches corticales. (C) Profile des connexions fonctionnelles excitatrices dans l'axe horizontal enregistrées dans les neurones des couches 5 du cortex S1Bf. (adaptés de DeNardo et al. 2015, Narayanan et al. 2015 et Schnepel et al. 2015).

horizontales s'étendent de façon similaire dans l'axe medio-latérales et dans l'axe antéro-postérieures (DeNardo et al., 2015) c'est pourquoi aucune distinction ne sera faite entre ces deux connectivités dans la suite du paragraphe (Figure 7).

Les neurones des couches 2/3 se connectent premièrement avec les neurones des L2/3 des colonnes adjacentes (Adesnik and Scanziani, 2010; DeNardo et al., 2015; Narayanan et al., 2015) avec une connectivité à plus grande distance avec les neurones de la couches 3 ($\approx 600\mu\text{m}$) que pour les cellules pyramidales de L2 ($\approx 400\mu\text{m}$) (Narayanan et al., 2015) (Figure 7). Ces neurones des L2/3 contactent également des neurones des couches 4 et 5 au sein des colonnes corticales adjacentes (DeNardo et al., 2015; Schnepel et al., 2015). Globalement, les connexions horizontales qui émanent des L2/3 peuvent être observées jusqu'à une distance de $1100\mu\text{m}$, avec un maximum observé dans un rayon de $500\mu\text{m}$ et avec une courbe de dispersion asymétrique dans l'axe antéro-postérieur en faveur des connectivités postérieures (DeNardo et al., 2015) (Figure 7). La connexion en direction des neurones de la couche 5 des colonnes corticales adjacentes participe au transfert de l'information sensorielle entre les colonnes corticales (Adesnik and Scanziani, 2010).

Au niveau de la couche 4 du cortex somatosensoriel, il y a une dichotomie forte entre la représentation cellulaire qui participe à la connectivité verticale et horizontale. Ainsi, parmi les neurones des couches 4 décrits précédemment, seules les cellules de type pyramidal participent aux échanges transcolonnaires qui sont majoritairement en direction des neurones de L4 des colonnes adjacentes mais qui peuvent également cibler des neurones des couches 2/3 et 5 (Schubert et al., 2003; Staiger et al., 2004; Narayanan et al., 2015). Cette connectivité en couche 4 est la plus restreinte en terme de distance par rapport aux autres couches corticales ($\approx 450\mu\text{m}$) (Narayanan et al., 2015) (Figure 7).

La connectivité horizontale au sein de la couche 5 a largement été étudiée car elle présente une grande richesse d'interconnexions entre couches. En effet, comme on a pu le voir précédemment, les neurones de la couche 5 reçoivent des connexions horizontales de toutes les autres couches corticales (Figure 7). Du point de vue des projections, les neurones de L5 envoient des connexions horizontales essentiellement de façon intralaminaires (Schnepel et al., 2015; DeNardo et al., 2015; Narayanan et al., 2015; Adesnik and Scanziani, 2010). Ces connexions transcolonnaires sont majoritairement assurées par les neurones dont la décharge

se fait en bouffées (Staiger et al., 2016). Des connexions ont été détectées jusqu'à 2 mm dans l'axe antéropostérieur du cortex somatosensoriel chez le rat (Schnepel et al., 2015) (Figure 7). De cette couche partent également des connexions qui se propagent vers les neurones des couches 2/3 des autres colonnes et qui s'étendent sur une distance allant jusqu'à 1,1 mm avec une asymétrie privilégiant les connexions en direction de la partie postérieure du cortex S1 (DeNardo et al., 2015; Narayanan et al., 2015). La forte interconnexion horizontale entre les neurones des couches 5 des différentes colonnes permet notamment les transferts et l'intégration de l'information sensorielle (Adesnik and Scanziani, 2010; Wester and Contreras, 2012).

Les neurones de la couche 6 restreignent leurs projections horizontales aux couches sous-granulaires (Figure 7). En effet, ils connectent principalement des neurones des couches 5 et 6 (DeNardo et al., 2015; Narayanan et al., 2015; Schnepel et al., 2015). Ces connexions sont maximales dans un rayon de 600 µm et peuvent s'étendre jusqu'à 1,7 mm dans le cortex somatosensoriel (Schnepel et al., 2015; DeNardo et al., 2015) (Figure 7) et même s'étendre au-delà du cortex S1, le connectant ainsi à d'autres aires corticales (Narayanan et al., 2015).

Deux études récentes ont qualifié de manière structurale les connexions horizontales au sein du S1Bf et montrent qu'il existe une légère asymétrie entre les connexions horizontales dans l'axe medio-latéral et celles dans l'axe antéro-postérieur (Narayanan et al., 2015; DeNardo et al., 2015) (Figure 7). Ainsi, il y a 12% de plus de connexions horizontales dans le sens antéropostérieur (Narayanan et al., 2015). De plus, il y a une différence en terme de préférence de projection car, là où les connexions medio-latérales semblent favoriser une communication entre les couches supragranulaires, les connexions antéropostérieures vont quant à elles favoriser les communications entre les couches infragranulaires (Narayanan et al., 2015).

En résumé, les connexions corticales horizontales, longtemps sous-estimées, semblent être essentielles dans la propagation mais également dans l'intégration des informations sensorielles. De plus, les neurones pyramidaux de la couche 5 ont un rôle central car ils reçoivent des projections horizontales de toutes les couches corticales et projettent de manière importante aux autres colonnes corticales de façon intralaminare.

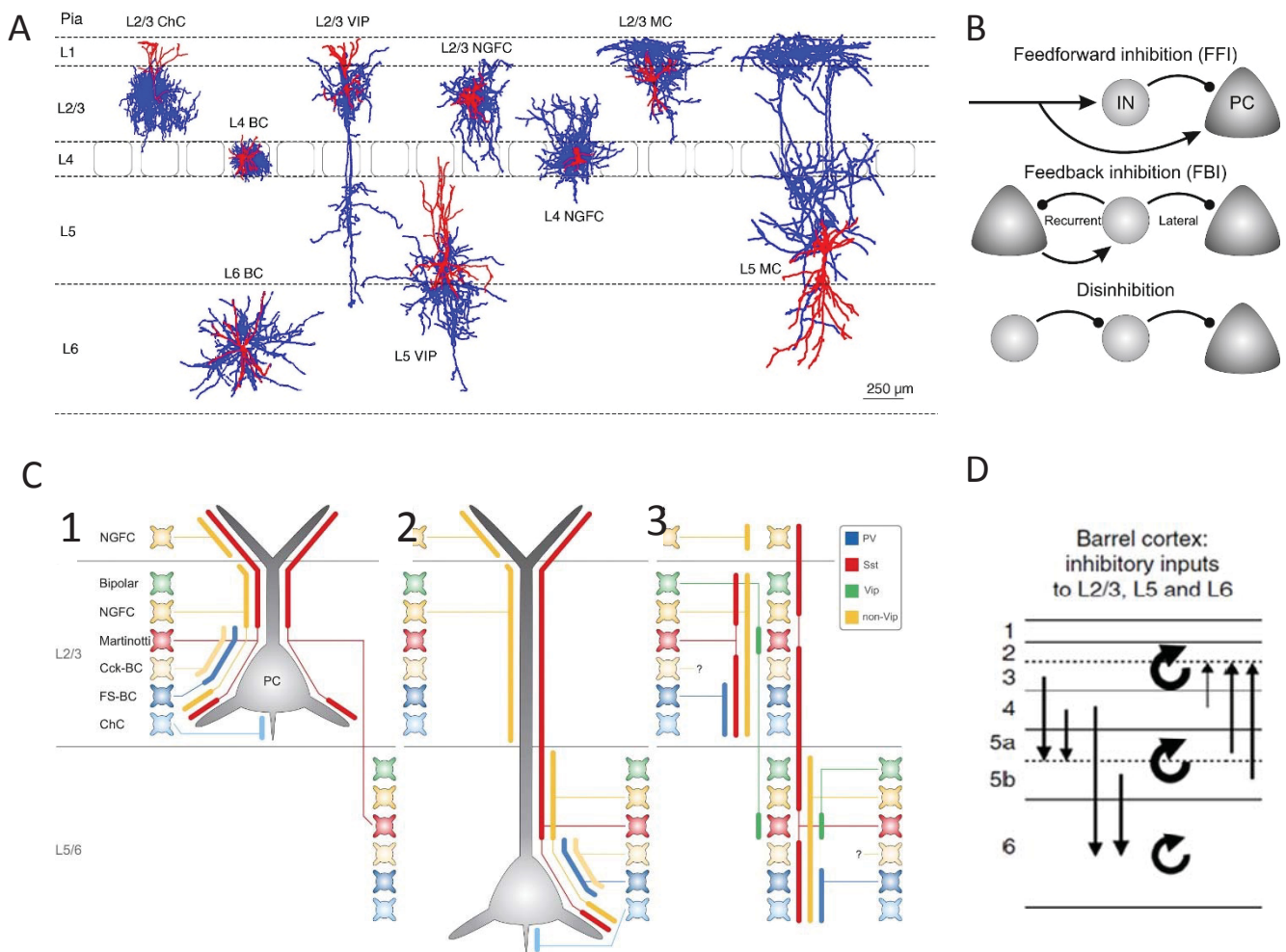


Figure 8: Connectivité des interneurons GABAergiques corticaux. (A) Arborisation axonale (bleu) et dendritique (rouge) des formes typiques d'interneurones. (B) Motifs de connexion des interneurons. (C) Site de connexion des interneurons sur les cellules pyramidales en L2/3 (1), en L5/6 (2) et sur les interneurons eux-mêmes (3). (D) Schéma résumant la connectivité des interneurons déterminée par traçage synaptique rétrograde. (adaptés de Tremblay et al. 2016, Feldmeyer et al. 2017 et DeNardo et al. 2015).

2.2.3. Connectivité inhibitrice

Les interneurones inhibent et ainsi contrôlent soit l'intégration de l'information des neurones sur lesquels ils agissent, en d'autres termes l'*input*, soit directement l'activité de ces neurones, i.e. l'*output*. Leurs contacts se font principalement localement (Xu and Callaway, 2009; Fino and Yuste, 2011) même si, plus rarement, des connexions inhibitrices translaminaires ont pu être mises en évidence, notamment de L5 vers les couches corticales plus superficielles (L2/3) (Brill and Huguenard, 2009) (Figure 8). Dans le cortex, il est estimé qu'un interneurone inhibe plus de 50% des neurones excitateurs dans un rayon de 100µm (Isaacson and Scanziani, 2011). La connectivité des interneurones GABAergiques peut être schématisée par trois motifs décrits au sein des circuits corticaux : la *feedforward inhibition*, la *feedback inhibition* et la désinhibition (Figure 8).

La ***feedforward inhibition*** correspond à une afférence excitatrice qui vient activer à la fois un neurone exciteur et un interneurone GABAergique ; l'interneurone projette également sur le neurone exciteur et peut donc inhiber ce neurone exciteur cible lorsqu'il est activé par l'afférence commune aux deux neurones (Figure 8). Ce circuit est notamment décrit en couche 4 du cortex S1 où les interneurones PV+ modulent les arrivées sous-corticales (Cruikshank et al., 2007).

Dans le cas de la ***feedback inhibition***, un neurone exciteur active par l'une des collatérales de son axone un interneurone qui en retour vient l'inhiber ce qui constitue une boucle d'auto- et de rétro-contrôle (Figure 8). Ce circuit, qui dépend plus de l'activité locale que la *feedforward inhibition*, est notamment présent en couche 5 du cortex somatosensoriel primaire où les cellules de Martinotti contrôlent localement les neurones pyramidaux (Silberberg and Markram, 2007). Ces neurones inhibiteurs, qui contactent localement de nombreuses cellules excitatrices (Fino and Yuste, 2011), peuvent en parallèle inhiber un grand nombre de cellules pyramidales et ainsi participer au phénomène d'inhibition latérale (Tremblay et al., 2016). L'inhibition latérale a notamment été décrite dans les couches L2/3 (Helmstaedter et al., 2009; Adesnik and Scanziani, 2010) et L5 (Silberberg and Markram, 2007). Ce type d'inhibition a principalement pour rôle de participer à la structuration fonctionnelle de la colonne corticale ainsi qu'à la sélection de l'information (Petersen et al., 2003a).

Enfin le phénomène de **désinhibition** correspond au fait qu'un interneurone GABAergique inhibe un autre interneurone, levant ainsi l'inhibition de ce dernier sur sa ou ses cellules cibles (Figure 8). Ce phénomène est notamment observé dans le cortex S1 où les interneurons VIP+ ciblent les cellules de Martinotti (Walker et al., 2016).

En résumé, les connexions neuronales intracorticales se font, au sein du cortex somatosensoriel primaire, de manière extrêmement stéréotypée. La parcellisation columnaire en unités fonctionnelles auxquelles s'ajoutent des microcircuits excitateurs et inhibiteurs permettent l'intégration et le codage fin de l'information sensorielle.

2.3. Connectivité longue distance

La connectivité à longue distance du cortex somatosensoriel primaire au sein du cerveau met en jeu principalement deux acteurs : (i) les aires corticales distantes et (ii) le thalamus. Ces connexions permettent la propagation d'une information mais également la modulation de la réponse à un stimulus.

2.3.1. Connexions avec les aires corticales distantes

Globalement, les couches sous-granulaires sont considérées comme les couches de sortie du cortex S1. Les neurones de L5 envoient notamment des afférences vers le cortex moteur primaire (M1) (Miyamichi et al., 2011) et reçoivent également des afférences provenant des neurones des couches infragranulaires du cortex moteur (Veinante and Deschênes, 2003; DeNardo et al., 2015) (Figure 9). Ces neurones des couches profondes reçoivent aussi des connexions du cortex somatosensoriel secondaire, des autres aires du cortex S1 (S1FI, S1HI,...) ou encore du cortex moteur secondaire

et al., 2015) ainsi que de l'hémisphère controlatérale bien que ces connexions semblent majoritairement concerner les tonneaux les plus latéraux (Petreanu et al., 2007). Les connexions avec le cortex moteur jouent un rôle important dans l'initiation et le contrôle du mouvement des vibrisses (Manita et al., 2015; Sreenivasan et al., 2016).

2.3.2. Connexions avec le thalamus

Le thalamus est une structure essentielle dans le traitement et le transfert de l'influx nerveux de la périphérie jusqu'au cortex et repose sur une connectivité importante et bidirectionnelle avec le cortex. En effet, la majorité des afférences longue distance du S1 proviennent du thalamus (DeNardo et al., 2015).

2.3.2.1. Connexions thalamo-corticales

La connectivité avec les aires sous-corticales se fait majoritairement avec le thalamus et plus particulièrement avec les noyaux ventropostérieur médian (VPM) et postérieur médian (POm).

Les neurones du VPM contactent principalement les neurones excitateurs de la couche 4, dite couche d'entrée du thalamus, au niveau cortical, et dans une moindre mesure les neurones en L5B et L6 (Bureau et al., 2006; Oberlaender et al., 2012; Constantinople and Bruno, 2013; DeNardo et al., 2015). Les projections du VPM vont ainsi faire un maximum de contacts synaptiques en L4 (Wimmer et al., 2010; Meyer et al., 2010a, 2010b; Oberlaender et al., 2012). Ainsi chaque neurone de L4 reçoit en moyenne 85 contacts provenant du thalamus (Lübke and Feldmeyer, 2007). Les neurones du VPM contactent également des interneurons inhibiteurs en L4 (Porter et al., 2001; Cruikshank et al., 2007; Wall et al., 2016). Ces interneurons répondent plus rapidement que les neurones excitateurs coactivés par la même afférence thalamique et participent ainsi à des mécanismes de régulation de type *feed forward inhibition* (Porter et al., 2001; Cruikshank et al., 2007).

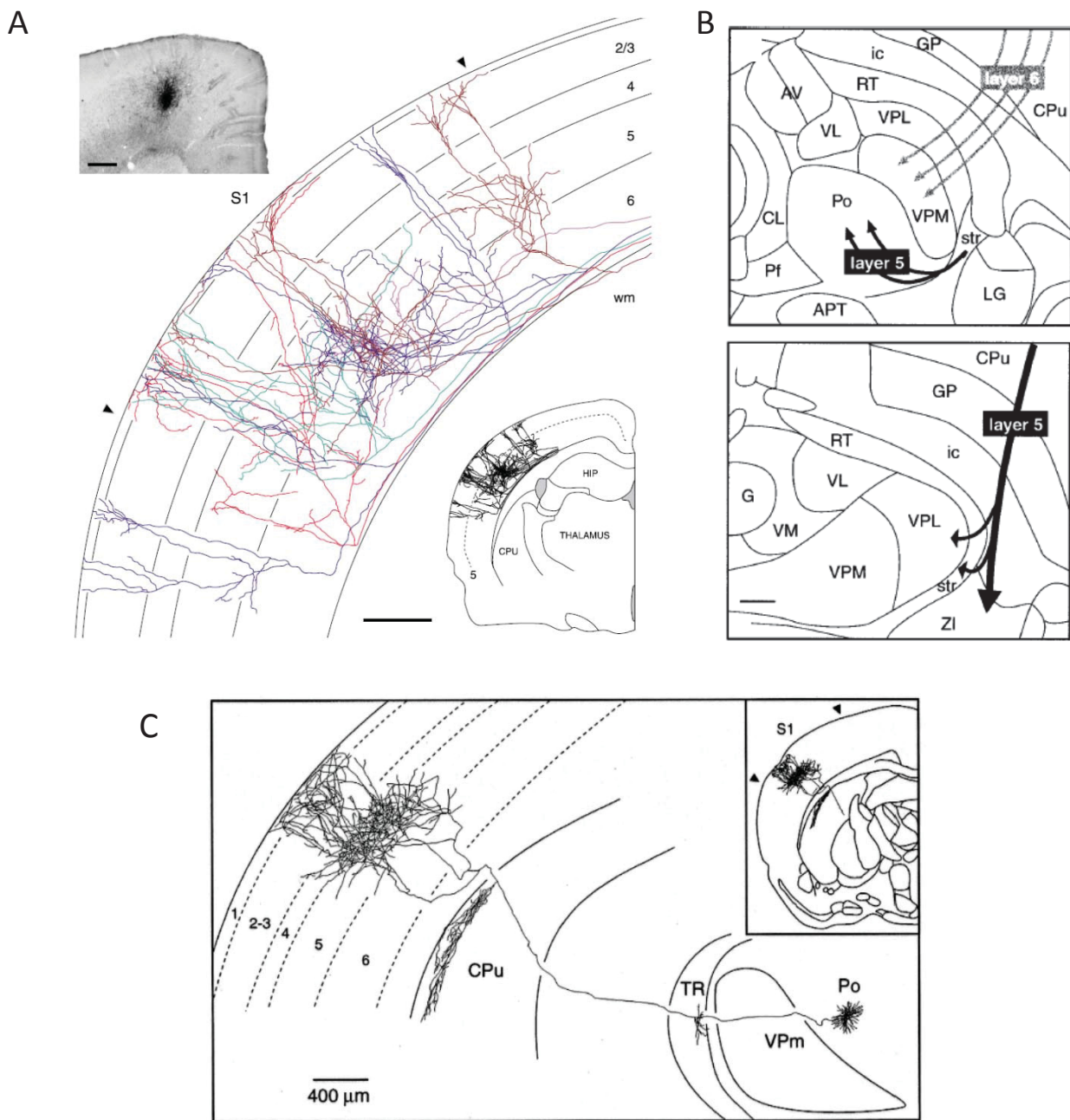


Figure 9: Connectivité longue distance des neurones du cortex somatosensoriel primaire. (A) Traçage des afférences venant du cortex moteur reçues par les neurones du cortex S1Bf. (B) Schématisation des connexions cortico-thalamiques. (C) Projection d'un neurone du noyau postérieur médian (Pom) du thalamus en direction du cortex S1Bf. (adaptés de Deschênes et al. 1998, Veinante et al. 2000 et Veinante et Deschênes 2003).

Les neurones du POm contactent des neurones excitateurs du cortex somatosensoriel primaire principalement au sein de la couche 5A (Bureau et al., 2006; Meyer et al., 2010a; Wimmer et al., 2010; DeNardo et al., 2015; Audette et al., 2017) (Figure 9). Une étude récente rapporte que tous les neurones de la couches 5A sont contactés par le POm et que, par rapport aux autres couches, c'est dans celle-ci que les plus grandes réponses post-synaptiques sont enregistrées lorsque l'on stimule ce noyau thalamique (Audette et al., 2017). Dans une moindre mesure, des connexions ont également été détectées en couche 1 et dans la partie haute de la couche 2 (Audette et al., 2017; Meyer et al., 2010a, 2010b; Deschênes et al., 1998; Jouhanneau et al., 2014) (Figure 9). En L5, le POm contacte également des neurones inhibiteurs de type PV+ et 5HT3a+ (Wall et al., 2016; Audette et al., 2017). Les interneurones PV+ ainsi activés participent à une régulation des neurones excitateurs par *feed forward inhibition* (Audette et al., 2017). En couche L2, le POm contacte spécifiquement les interneurones porteurs du récepteur 5HT3a (Audette et al., 2017).

2.3.2.2. Connexions cortico-thalamiques

Les connexions du S1 vers le thalamus se font essentiellement à partir des neurones pyramidaux des couches sous granulaires (Deschênes et al., 1998; Veinante et al., 2000).

A partir des neurones de la couche 5B, les fibres corticothalamiques ciblent le POm (Veinante et al., 2000; Mease et al., 2016) (Figure 9). Ces connexions se font par l'intermédiaire de collatérales de fibres qui poursuivent leur chemin en direction du tronc cérébral et de la moelle épinière (Veinante et al., 2000).

En couche L6, les neurones pyramidaux envoient des fibres en direction du VPM (Veinante et al., 2000) (Figure 9). Contrairement à ce qui est observé pour le POm, ces connexions ne sont pas réalisées par des fibres passantes. Par contre, elles envoient des collatérales vers un troisième noyau thalamique : le noyau réticulé du thalamus (nRT) (Deschênes et al., 1998; Veinante et al., 2000). Le nRT est un noyau composé de neurones inhibiteurs qui, grâce à des circuits de *feed forward inhibition*, module la réponse thalamique induite par l'influx cortical (Pinault, 2004; Paz and Huguenard, 2015).

En conclusion, la connectivité à longue distance du cortex somatosensoriel primaire se fait majoritairement avec le thalamus et des aires corticales motrices et associatives. Ces connexions sont pour la plupart réciproques et permettent ainsi d'intégrer au mieux les informations sensorielles reçues.

3. La fonction du S1 : exemple du cortex en tonneaux

Le cortex somatosensoriel primaire (S1) a pour rôle premier de traiter les informations somesthésiques reçues de la périphérie. Cette intégration de l'information sensorielle se fait de manière spécialisée où chaque partie du corps est représentée par une aire spécifique du S1. Ainsi, chez le rongeur, le S1 est une aire globalement latérale qui s'étend d'avant en arrière sur près de 8 mm, avec les parties codant pour les pattes (S1FL et S1HL) en position les plus médianes et la partie qui code pour la lèvre supérieure en position la plus latérale (S1ULp) (Paxinos and Watson, 2007). Entre ces deux parties se trouve la zone du S1 qui occupe la plus grande aire. Elle correspond à la zone somesthésique la plus importante en taille pour le rat, qui est dédiée aux vibrisses et qui est appelée le cortex en tonneaux ou *barrel field* (S1Bf). Ce cortex a la particularité de présenter au niveau de la couche 4 un épaissement de la densité neuronale qui ressemble à des tonneaux d'où son nom (Figure 5). Ces tonneaux sont juxtaposés et l'espace qui les sépare et par lequel passe les axones et les dendrites est appelé septa.

Ainsi, pour le rat, comme pour tous les rongeurs, la sensorialité tactile la plus importante est celle des vibrisses (Woolsey and Van der Loos, 1970) qui leur permet notamment de détecter des objets dans leur environnement et de se repérer dans l'espace (Kleinfeld et al., 2006; Petersen, 2007; Feldmeyer et al., 2013). De nombreuses études se sont intéressées au décodage de la fonctionnalité du S1Bf pour différentes raisons : (i) c'est un

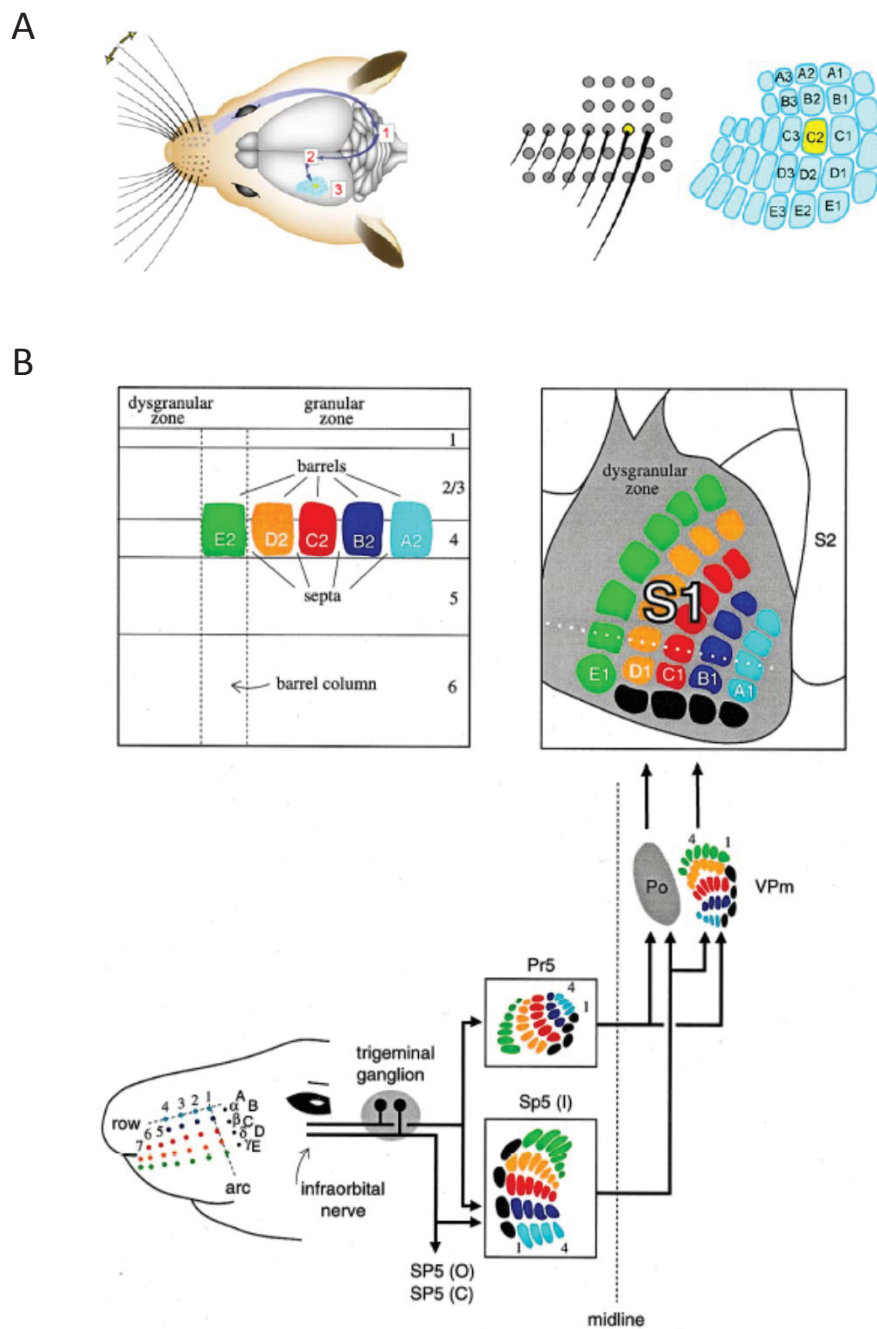


Figure 10: Des vibrisses au cortex en tonneaux. (A) Les vibrisses sont organisées sur le museau du rat comme les colonnes dans le S1Bf en 5 colonnes et 9 arcs. (B) Schéma de la transduction du signal de la vibrisse au cortex. (adaptés de Petersen 2007 et Deschênes et al. 1998).

organe sensoriel essentiel aux rongeurs et (ii) son organisation anatomique est bien connue et stéréotypée.

3.1. Description macroscopique de la matrice mystaciale

Les vibrisses sont placées sur le museau des rongeurs de manière bilatérale et symétrique. On compte entre 30 et 36 vibrisses organisées en une matrice de 5 colonnes et 9 arcs qui composent la matrice mystaciale ou matrice des vibrisses (Figure 10). La longueur des vibrisses augmente progressivement dans l'axe antéro-postérieur (Brecht et al., 1997). Ces vibrisses permettent au rongeurs de détecter des objets et de se repérer dans leur environnement (Kleinfeld et al., 2006; Petersen, 2007). Cette fonctionnalité est essentielle pour les rats dont la vue est mauvaise et dont l'habitat naturel est composé de galeries. Les vibrisses vont vibrer de manière ample et à faible fréquence ($\approx 10\text{Hz}$) lors de l'exploration d'un environnement ou d'un objet et à des fréquences beaucoup plus élevées (100-1000Hz) lors de discrimination de textures (Kleinfeld et al., 2006).

3.2. Transduction du signal sensoriel

3.2.1. De la vibrisse au cortex

Lors de la stimulation d'une vibrisse, les canaux mécanosensibles associés sont activés ce qui induit la génération de potentiels d'action (PA) qui se propagent dans la partie infra-orbitale du nerf trijumeau où un neurone répond spécifiquement à la déflexion d'une vibrisse dans un rapport de un pour un. Ce neurone sensoriel se connecte dans le tronc cérébral au niveau des noyaux trigéminaux (PR5 et SP5) où on trouve une représentation somatotopique des vibrisses appelée barrettes (Deschênes et al., 1998; Veinante and Deschênes, 1999) (Figure 10). Soixante-huit pourcent des fibres qui partent de ces noyaux trigéminaux contactent les neurones du noyau VPM du thalamus controlatéral avec là aussi une

représentation somatotopique de la matrice mystaciale : les barréloïdes (Veinante and Deschênes, 1999) (Figure 10). Les neurones cortico-thalamiques du VPM vont ensuite se projeter au niveau de la couche 4 du S1Bf décrit précédemment. A ce niveau, la représentation somatotopique est constituée de barres ou tonneaux organisés de la même manière que les vibrisses sur le museau du rongeur (Woolsey and Van der Loos, 1970). Cette voie de transduction de signal des vibrisses est appelée voie lemniscale et est caractérisée par des champs récepteurs spécialisés pour chaque vibrisse (Veinante and Deschênes, 1999) (Figure 11). Le thalamus est ici plus qu'un simple relais puisqu'il filtre l'information envoyée au cortex, notamment en fonction de l'état d'éveil cortical (Castro-Alamancos, 2002a, 2002b, 2002c).

Parallèlement, la voie paralemniscale envoie les axones des neurones sensoriels du noyau trijumeau spinal (barrelettes) vers le noyau POm du thalamus et de là vers le cortex S1, le cortex somatosensoriel secondaire (S2) et le cortex moteur. La voie paralemniscale est caractérisée par une intégration multi-vibrisses (Veinante and Deschênes, 1999) (Figure 11).

Finalement, il existe également une voie dite extralemniscale qui projette du noyau trijumeau spinal vers le VPM puis vers les septa du S1 et vers le S2 (Pierret et al., 2000).

3.2.2. La voie canonique intracolonnaire

Le circuit dit « canonique » est la voie classique de propagation et d'intégration de l'information sensorielle au sein de la colonne corticale (Figure 11). Il se met progressivement en place au cours du développement cortical pour se stabiliser après la fin de la deuxième semaine de vie (Bureau et al., 2004; van der Bourg et al., 2016). Son développement inclut la mise en place des connexions régissant le transfert d'information (Bureau et al., 2004) mais il existe également un raffinement de ces connexions conduisant à une augmentation progressive de la sélectivité des neurones d'une colonne à une stimulation donnée (van der Bourg et al., 2016). Ce circuit est cohérent avec les probabilités de connexions fonctionnelles et les recouvrements structuraux des dendrites et des axones décrits précédemment. Ainsi, l'influx sensoriel arrive aux neurones étoilés de la couche 4 du cortex somatosensoriel depuis le noyau VPM du thalamus par la voie lemniscale (Figure 11). L'activation de la colonne

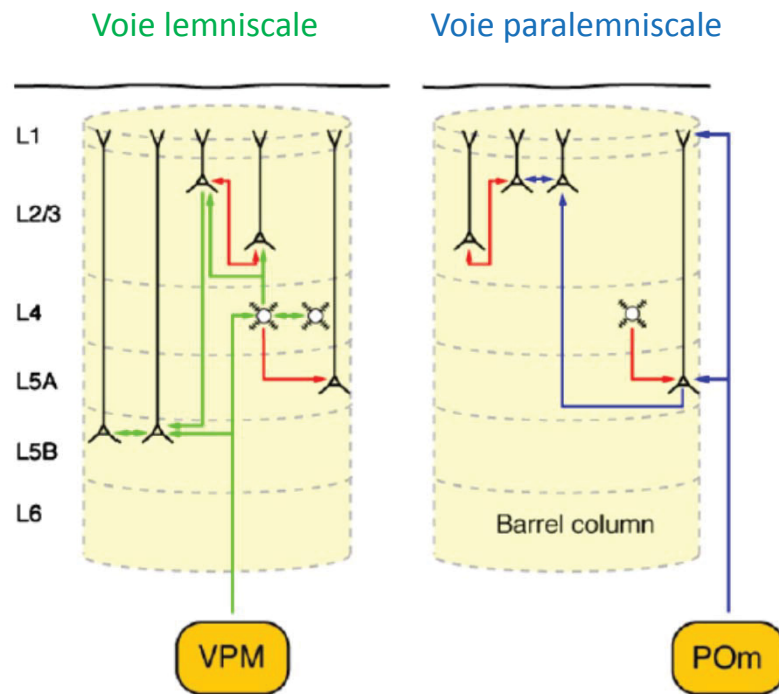


Figure 11: Schéma des voies lemniscale (vert) et paralemniscale (bleue). La voie lemniscale se poursuit au niveau intracortical par la voie canonique de transfert de l'information à savoir L4→L2/3→L5 (adapté de Feldmeyer et al. 2013).

associée à la vibrisse concernée se fait généralement en 8 à 10 ms après la stimulation (Petersen et al., 2003b; Ferezou et al., 2007; Reyes-Puerta et al., 2015). Cet influx est également reçu par les interneurones et il a notamment été démontré que les interneurones inhibiteurs *fast spiking* de la couche 4 reçoivent une plus grande quantité d'information du thalamus que les neurones excitateurs (Cruikshank et al., 2007; Reyes-Puerta et al., 2015). De plus, leur activation est plus rapide que celle des cellules glutamatergiques. Cela permet de distinguer deux mécanismes locaux d'inhibition à savoir la *feed forward inhibition*, qui présente une latence courte et qui correspond à l'activation directe des interneurones par les afférences thalamiques induisant une inhibition des neurones excitateurs de L4, et les mécanismes d'inhibition en *feed back* qui sont plus lents et qui correspondent au rétrocontrôle inhibiteur initié par les cellules excitatrices elles-mêmes en réponse à l'influx thalamique (Cruikshank et al., 2007). Ces mécanismes d'inhibition en L4 permettent notamment de filtrer et de mieux détecter et intégrer l'information sensorielle (Yu et al., 2016).

La voie canonique permet ensuite le transfert de l'influx de la couche 4 aux neurones de la couche 2/3 (Figure 11). Ce transfert se fait de manière préférentielle au sein de la colonne corticale et en dépasse peu les frontières (Shepherd et al., 2003; Shepherd and Svoboda, 2005). La restriction de l'information au sein de la couche 2/3 de la même colonne corticale est notamment permise par l'inhibition latérale des couches 2/3 des colonnes corticales adjacentes (Petersen and Sakmann, 2001). Ensuite, l'information intégrée par les neurones de la couche supragranulaire est transmise aux neurones des couches 5 et 6 du S1 pour être ensuite dirigée vers les aires sous-corticales et notamment le thalamus comme décrit précédemment, mais aussi en direction du tronc cérébral. D'autre part, l'influx sensoriel peut être transmis à d'autres aires corticales (cortex moteur, cortex somatosensoriel secondaire, ...) ou aux neurones des colonnes corticales adjacentes par l'intermédiaire des connexions horizontales.

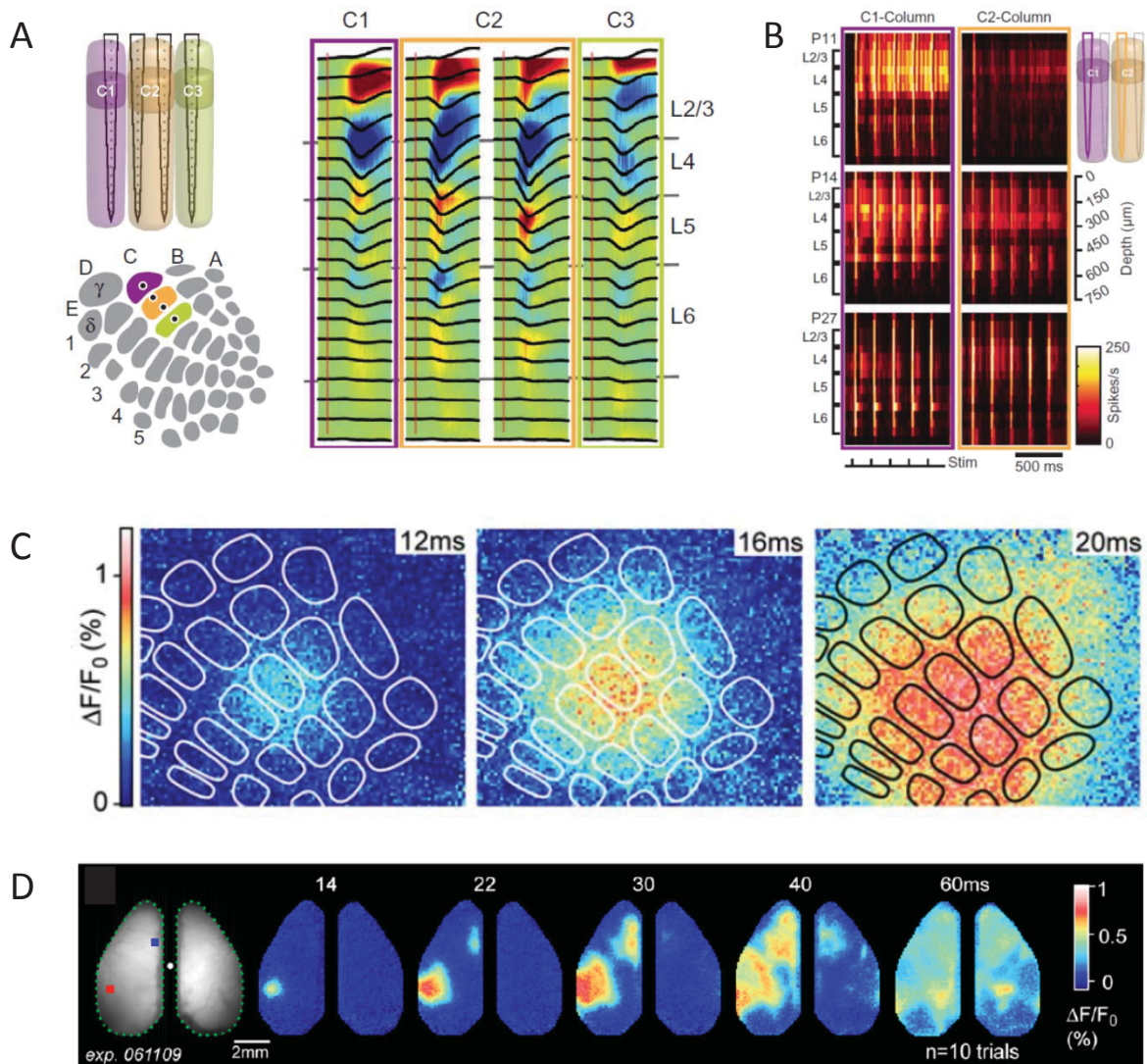


Figure 12: Propagation horizontale de l'information après stimulation d'une vibrisse. (A) Propagation du potentiel évoqué par stimulation de la vibrisse C1 dans les colonnes C2 et C3. (B) L'activation des neurones des colonnes adjacentes augmente avec la maturation cérébrale entre P11 et P27. (C) Propagation de l'information entre les barrels mesurée par Voltage Sensitive Dye (VSD). (D) Propagation de l'information sensorielle au sein du S1Bf puis au cortex moteur et à l'hémisphère controlatérale enregistré par VSD. (adaptés de Van der Bourg et al. 2016, Ferezou et al. 2006 et Ferezou et al. 2007).

3.2.3. Intégration et propagation horizontale

De plus en plus d'études s'intéressent à la communication entre les colonnes corticales et ainsi à la propagation de l'information sensorielle véhiculée par ces connexions. Lors de stimulations des vibrisses, on enregistre une réponse dans la colonne corticale de référence (cf. propagation par la voie canonique) mais également dans les colonnes corticales adjacentes et *in fine* au sein d'autres structures corticales et notamment le cortex moteur (Figure 12) (Ferezou et al., 2007; Merre et al., 2018). Cette propagation horizontale augmente progressivement lors de la maturation corticale (van der Bourg et al., 2016) (Figure 12). Ainsi, dans un cortex adulte, suite à la stimulation d'une vibrisse, on peut enregistrer une activation dans les colonnes adjacentes environ 12 ms après (Ferezou et al., 2006; Reyes-Puerta et al., 2015) (Figure 12). Cette activité évoquée par la stimulation de la vibrisse se propage à la totalité du S1 et envahit le cortex moteur 15 ms après la stimulation puis le cortex S1 controlatéral 15 ms plus tard (Ferezou et al., 2007) (Figure 12). D'un point de vue mécanistique, la propagation de l'information sensorielle observée en L2/3 (Ferezou et al., 2007) semble néanmoins refléter un passage par les neurones des couches 5. Un schéma de propagation a été proposé où l'activation des neurones en couche 2/3 serait limitée dans cette couche grâce à des mécanismes d'inhibition latérale mais permettrait l'activation des neurones en L5 qui à leur tour, et de manière intralaminaire, propagerait cette information sensorielle de proche en proche à travers les colonnes fonctionnelles (Adesnik and Scanziani, 2010). Même si la propagation horizontale dans le S1Bf ne se fait pas uniquement par l'intermédiaire de la couche L5, les neurones qui la constituent ont, d'un point de vue structurel et fonctionnel, la capacité de recevoir de l'information des différentes couches corticales et peuvent ainsi favoriser la propagation horizontale de cette information (Schnepel et al., 2015).

Il a également été suggéré que cette « route » de propagation horizontale passant par les neurones de la couche 5 du cortex somatosensoriel primaire permet, outre le transfert d'une activité physiologique, la propagation d'une activité paroxystique (Telfeian and Connors, 1998).

Globalement, le transfert horizontal d'influx physiologique et sensoriel de manière horizontale au sein du cortex somatosensoriel primaire permet notamment de détecter la redondance d'information au sein des différentes colonnes corticales afin de pouvoir adapter la réponse à une stimulation (Boucsein, 2011; Schnepel et al., 2015).

3.3. Modulation de la réponse sensorielle par l'activité corticale

3.3.1. Modulation liée à l'activité neuronale

Le codage de l'information sensorielle est modulé par différents aspects de l'activité intrinsèque du cortex. De manière générale, ce codage est décrit comme redondant (Harris and Mrsic-Flogel, 2013). Cette redondance permet notamment de diminuer le bruit de fond et ainsi de favoriser et d'augmenter la sélectivité de réponse à un stimulus donné (Harris and Mrsic-Flogel, 2013). Néanmoins, l'effet de la redondance n'est pas aussi efficace si l'on compare les couches corticales entre elles. En effet, si un neurone a une activité faible, l'information qu'il véhicule à chacune de ses interventions sera plus importante et plus simple à moduler que l'information d'un neurone qui présente une activité de base plus soutenue. C'est notamment le cas si on compare les neurones des couches supragranulaire et infragranulaire du cortex S1Bf. Les neurones des couches 2/3 ont une activité spontanée faible (Poulet and Petersen, 2008; Crochet et al., 2011) ($\approx 1\text{Hz}$) qui leur confère une forte sélectivité aux stimuli et participe ainsi au codage du champ récepteur (O'Connor et al., 2010). En comparaison, les neurones des couches 5/6 ont une activité de base plus soutenue ($\approx 5\text{-}15\text{ Hz}$) qui ne peut être modulée que par une variation de la fréquence de leur activité. Ceci leur confère une plus faible capacité à coder de manière fine l'information sensorielle (O'Connor et al., 2010). Ainsi, une différence majeure de codage de l'information sensorielle entre les couches corticales vient de l'activité de base des neurones qui est faible et peu synchrone en L2/3 et plus dense en L5/6 (Harris and Mrsic-Flogel, 2013; Petersen and Crochet, 2013).

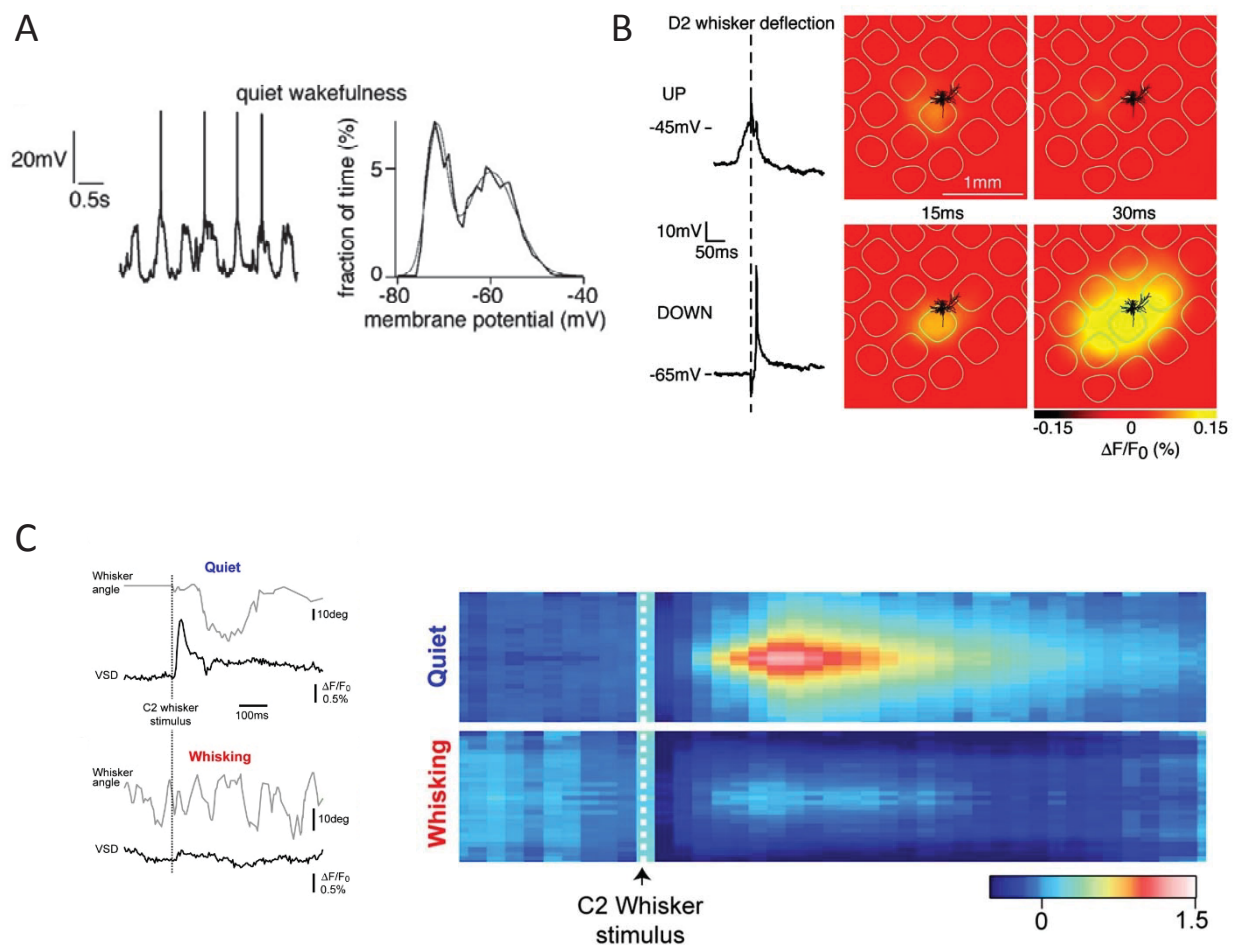


Figure 13: Modulation de la réponse sensorielle évoquée dans le cortex somatosensoriel primaire après stimulation des vibrisses. (A) Les *up and down states* sont caractérisés par deux potentiels de membrane majoritaires, entre lesquelles les cellules oscillent. (B) Une stimulation lors d'un *up state* se propage moins que en *down state*. (C) La stimulation de la vibrisse C2 déclenche une réponse VSD plus importante lorsque les vibrisses sont au repos que lorsqu'elles sont actives (adaptés de Petersen et al 2003a et Ferezou 2006).

3.3.2. Modulation liée à l'activité de réseau

L'activité spontanée du cortex peut également moduler la réponse sensorielle (Poulet and Petersen, 2008; Crochet and Petersen, 2009). En effet, lors de la stimulation d'une vibrisse, les réponses enregistrées présentent une grande variabilité inter-essai en terme d'amplitude et de latence (Petersen et al., 2003a; Ferezou et al., 2007; Egger et al., 2015). Cette variabilité est liée à l'état intrinsèque du cerveau lors de la stimulation. On peut distinguer deux catégories d'états : (i) le phénomène de « *up and down states* » qui représente les variations synchrones et rythmiques des potentiel de membranes des neurones dans l'espace et le temps (Beltramo et al., 2013) et (ii) les niveaux de vigilance de l'animal lors de la stimulation.

Les *up and down states* ont été étudiés dans différents cortex sensoriels et sont présents en l'absence de tout stimulus sensoriel (Cossart et al., 2003) ce qui souligne le caractère intrinsèque de telles modulations. Les phases *up* et les phases *down* correspondent à une succession rythmique de période de dépolarisation (= *up*) et d'hyperpolarisation (= *down*) des potentiels de membrane des neurones d'une structure (Figure 13). Ainsi, si une stimulation arrive au cortex lors d'une phase *up*, la réponse sera plus faible, moins ample et moins étendue qu'en phase *down* (Petersen et al., 2003a; Fox, 2018) (Figure 13). Ainsi, paradoxalement, même si en *up state* les neurones sont plus dépolarisés, ils vont répondre de manière plus faible, en générant moins de potentiels d'action, que pendant les *down states* (Petersen et al., 2003a). Ces *up and down states* sont générés par les neurones pyramidaux des couches L5 et modulés par les interneurones au sein du cortex S1Bf (Petersen et al., 2003a; Beltramo et al., 2013) tout comme dans d'autres cortex sensoriels (McCormick and Sanchez-Vives, 2000; Lőrincz et al., 2015). Ces variations d'état des neurones peuvent permettre de coder de manière fine l'intégration sensorielle notamment en fonction du contexte puisqu'ici l'activité spontanée inhibe l'activité évoquée (Petersen et al., 2003a).

Le deuxième niveau de modulation du codage sensoriel abordé ici est lié à l'état de vigilance de l'animal lors de la stimulation des vibrisses. Lorsque l'animal est éveillé et libre de ses mouvements, s'il touche activement un objet avec ses vibrisses, comme pendant un

comportement exploratoire, la réponse évoquée au niveau du S1Bf est plus importante que si la stimulation est involontaire (Ferezou et al., 2006). Ainsi la réponse évoquée sera de plus forte amplitude et se propagera de manière plus importante au niveau cortical. Par contre, si l'animal est dans un état de veille calme, une stimulation passive de ses vibrisses entrainera une réponse importante au niveau du cortex (Ferezou et al., 2006). Cette réponse exacerbée pendant la veille peut servir de système d'alarme et de détection d'éléments en approche (Ferezou et al., 2007). La plus grande réponse évoquée lors d'un comportement exploratoire actif peut quant à elle être expliquée par une activation des interneurons VIP+ du cortex somatosensoriel primaire par des afférences excitatrices provenant de la partie du cortex moteur codant pour le mouvement des vibrisses. Ces neurones VIP+ ainsi activés vont inhiber les interneurons SOM+ du S1Bf (Walker et al., 2016) qui sont responsables de l'inhibition tonique des cellules pyramidales. La levée de cette inhibition par un mécanisme de *feed forward inhibition* entraine une réponse plus importante des cellules pyramidales lors de l'arrivée de l'influx sensoriel au niveau du S1Bf (Gentet et al., 2012).

En résumé, le cortex somatosensoriel primaire est une structure corticale hautement organisée tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. En effet, la connectivité au sein de la colonne corticale, entre les couches, et entre les colonnes se développent progressivement au cours de la mise en place et de la maturation corticale. Cette mise en place se fait de manière très précise afin de construire les microcircuits qui permettent le traitement et l'intégration de l'information sensorielle. Cette information provenant des vibrisses suit une voie de transduction typique entre la périphérie et le cortex en passant par le thalamus. La boucle thalamo-corticale joue donc un rôle important dans la fonction sensorielle même si la plus grande modulation de réponse et d'intégration de l'influx sensoriel se fait essentiellement au niveau du cortex.

Tableau 1 : Classification des crises

| |
|---|
| Crises généralisées |
| Tónico-clonique |
| Cloniques |
| Toniques |
| Atoniques |
| Myocloniques |
| Myocloniques |
| Myoclono atoniques |
| Myoclono toniques |
| Absences |
| Typiques |
| Atypiques |
| Absence avec caractéristique particulière |
| Absences myocloniques |
| Absences avec myoclonies palpébrales |

| |
|-----------------------|
| Crises focales |
| Inconnues |
| Spasmes épileptiques |

D'après Berg et al. 2010

Les épilepsies

1. Définition

L'épilepsie est l'une des affections neurologiques les plus répandues avec une prévalence de 0,8% selon l'OMS soit près de 50 millions de personnes qui souffrent de cette maladie à travers le monde (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/fr/>). L'incidence annuelle, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas pour une année, est de 0,05%. Cette pathologie touche aussi bien les hommes que les femmes et toutes les tranches d'âges mêmes si les individus jeunes et les personnes âgées présentent une plus grande prévalence que la population générale.

Le terme d'épilepsie vient du grec « *epilêpsia* » qui signifie « action de saisir » ou encore « attaque ». Ce terme fait référence au changement soudain de comportement qui accompagne la crise. Au niveau cellulaire, la crise est associée à une hypersynchronisation et une hyperexcitabilité d'un groupe de neurones ce qui est visible et donc objectivable le plus souvent sur l'enregistrement électroencéphalographique.

L'ILAE (International League Against Epilepsy) définit l'épilepsie par trois points : (i) survenue d'au moins deux crises non provoquées (ou réflexes) espacées de plus de 24h, (ii) une crise non provoquée (ou réflexe) et une probabilité de survenue de crises ultérieures au cours des 10 années suivantes similaire au risque général de récurrence (au moins 60%) observé après deux crises non provoquées et (iii) le diagnostic d'un syndrome épileptique (Fisher et al., 2014). Ainsi, c'est la répétition de ces crises qui est importante dans la définition de l'épilepsie.

Tableau 2 :Syndromes électrocliniques et autres épilepsies

| Syndromes électrocliniques organisés par âge de début |
|---|
| Période Néonatale |
| Epilepsie néonatale familiale bénigne |
| Encéphalopathie myoclonique précoce |
| Syndrome d'Ohtahara |
| Nourrisson |
| Epilepsie du nourrisson à crises focales migrantes |
| Syndrome de West |
| Epilepsie myoclonique du nourrisson |
| Syndrome de Dravet |
| Etc... |
| Enfant |
| Syndrome de Panayiotopoulos |
| Epilepsie à crises myocloniques atoniques (précédemment astatiques) |
| Epilepsie bénigne avec pointes centrotemporales |
| Epilepsie avec absences myocloniques |
| Syndrome de Lennox-Gastaut |
| Encephalopathie épileptique avec pointes-ondes continues au cours du sommeil |
| Syndrome de Landau-Kleffner |
| Epilepsie-absences de l'enfant |
| Etc... |
| Adolescence – Adulte |
| Epilepsie-absences de l'adolescent |
| Epilepsie myoclonique juvénile |
| Epilepsie à crises généralisées tonico-cloniques prédominantes |
| Epilepsie myoclonique progressive |
| Epilepsie autosomique dominante avec crises à symptomatologie auditive |
| Autres formes d'épilepsie temporale familiale |
| Epilepsies dont l'âge de début est moins spécifique |
| Epilepsie focale familiale à foyer variable (enfant et adulte) |
| Epilepsies réflexes |
| Constellations |
| Epilepsie temporale méssiale avec sclérose hippocampique |
| Syndrome de Rasmussen |
| Epilepsie à crises gélastiques et hamartome hypothalamique |
| Hémiconvulsion-hémiplégie-épilepsie |
| Epilepsies qui ne peuvent pas être classées dans une des catégories sus-citées et qui peuvent être reconnues par la présence ou l'absence d'une anomalie structurale ou métabolique (préssumé causale) et sur la base du mode de début de la crise (généralisées vs. focales) |
| Epilepsies en relation avec une anomalie structurale-metabolique |
| Malformations du développement cortical (hémimégalencephalie, hétérotopies, etc.) |
| Syndrome Neurocutané (Sclérose tubéreuse, Sturge-Weber, etc.) |
| Tumeur |
| Infection |
| Traumatisme |
| Angiome (Souffrance périnatale, Accident vasculaire, ...) |
| Epilepsies de causes inconnues |
| Conditions associées à des crises épileptiques et qui ne sont pas diagnostiquées comme une forme d'épilepsie (Crises néonatales bénignes, crises fébriles) |

D'après Berg et al. 2010

2. Classification

On distingue la classification des crises d'épilepsies de celle des types d'épilepsies ou syndromes épileptiques qui correspondent à la pathologie. La difficulté de ces classifications vient du fait qu'un même type de crise, principal symptôme d'une forme d'épilepsie, peut être retrouvé dans différents syndromes.

Les crises sont définies par un patron d'activité ou graphoélément enregistré par électroencéphalographie (EEG) et par les signes comportementaux ou signes cliniques qui y sont associés. On distingue ainsi deux grands types de crises : les crises généralisées et les crises focales. *Les crises généralisées* impliquent l'initiation de l'activité paroxystique au niveau d'un site et sa propagation bilatérale et synchrone dans les structures corticales et sous corticales (Berg et al., 2010). *Les crises focales* sont par définition limitées à un seul hémisphère, ou unilatérales, et recrutent un nombre plus restreint de neurones au niveau cortical ou sous-cortical. Dans certains cas, la crise focale peut se propager à l'ensemble du cortex ; on parle alors de généralisation secondaire (Tableau 1).

Les syndromes épileptiques sont définis à la fois par le type de crises, l'étiologie et l'âge de survenue. On distingue ainsi *les syndromes électrocliniques* organisés par âge de début qui sont le plus souvent liés à une cause génétique, *les constellations* liées à des lésions spécifiques, *les épilepsies structurales/métaboliques* qui font suite à une lésion ou une condition spécifique (métabolique ou structurelle) sans présentation électroclinique spécifique (Berg et al., 2010) (Tableau 2).

Lors de cette thèse, le travail a notamment porté sur un modèle d'épilepsie-absence chez le rat c'est pourquoi la description de ce syndrome sera détaillée dans le prochain paragraphe.

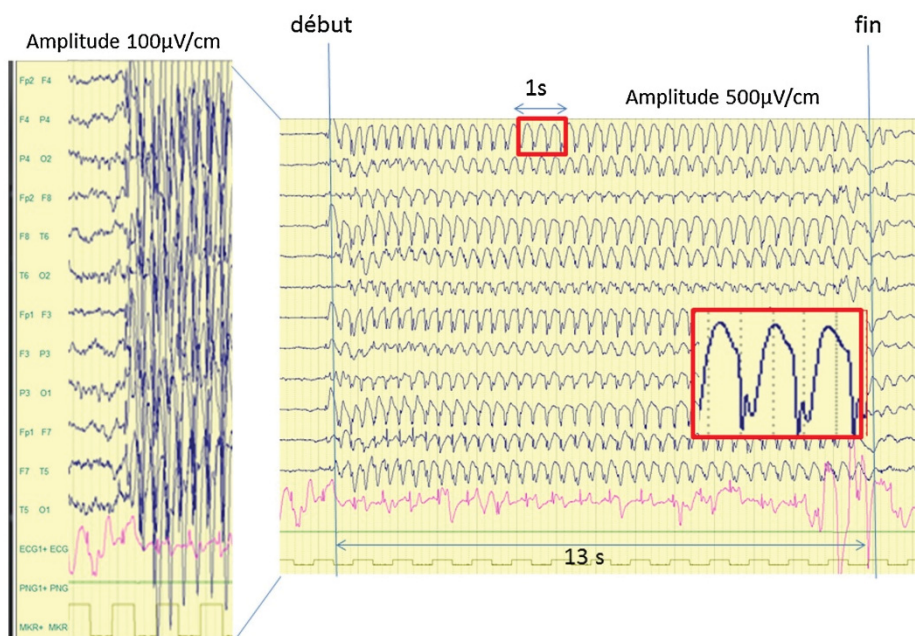


Figure 14: Enregistrement électroencéphalographique d'une crise d'absence chez l'Homme caractérisé par des décharges de pointes-ondes à 3 Hz présent sur l'ensemble des électrodes (Bouilleret and Maurey 2017).

3. Epilepsie-absence

L'épilepsie-absence de l'enfant (EAE) n'a été officiellement reconnue comme syndrome épileptique à part entière qu'en 1981. Ce syndrome représente 10% des épilepsies pédiatriques (Garzon et al., 2016).

3.1. Généralités

L'EAE est caractérisée par des crises généralisées non convulsives fréquentes (jusqu'à plusieurs centaines par jour) associées à une perte de contact avec l'environnement (Loiseau et al., 1995; Garzon et al., 2016; Depaulis et al., 2016). Ces crises sont caractérisées sur l'électroencéphalogramme par des décharges de pointes-ondes (DPO) ayant une rythmicité de 3 cycles/sec et qui commencent et se terminent de manière soudaine (Depaulis et al., 2016) (Figure 14). Ces décharges sont bilatérales et synchrones (Loiseau et al., 1995) et durent en moyenne 8 secondes (Garzon et al., 2016). Les DPO sont un marqueur d'EAE mais sont également observées dans d'autres syndromes comme l'épilepsie-absence de l'adolescent qui se différencie de l'EAE par un âge de survenue plus tardif, ou encore dans le syndrome de Landau-Kleffner où les DPO surviennent lors du sommeil. Un des facteurs déclenchant des crises est l'hyperpnée, qui peut d'ailleurs être utilisée en clinique lors de la phase diagnostique (Garzon et al., 2016).

3.2. Etiologie

L'étiologie de l'EAE est encore mal connue. Il est admis que ce syndrome génétique est d'origine polygénique. Les mutations les plus couramment observées, notamment dans des cas familiaux, concernent certaines sous-unités des récepteurs GABA (GABRG2, GABRA1), des canaux calciques voltage-dépendants (CACNA1A) ou des canaux sodiques voltages-dépendants (SCN1B, SCN1A) (Lerche et al., 2001; Yalçın, 2012). Dans les cas d'EAE à début

précoce, un déficit dans le transporteur au glutamate GLUT-1 (gène SLC2A1) a également été montré (Yalçın, 2012).

3.3. Pronostic

L'épilepsie absence de l'enfant est un syndrome défini comme auto-limité dans le sens où, dans la majorité des cas, la pathologie évolue vers une guérison spontanée. L'EAE survient entre 6 et 7 ans et l'âge médian de rémission est de 12 ans (Wirrell et al., 1997; Garzon et al., 2016).

3.4. Traitements

L'épilepsie-absence est dans la majorité des cas bien contrôlée par les médicaments anti-épileptiques. Deux études récentes ont montré que l'éthosuximide est le traitement de première instance à favoriser par rapport au valproate ou à la lamotrigine car il présente un meilleur effet sur les crises, à court et à long terme, ainsi que de faibles effets secondaires (Glauser et al., 2010, 2013; Berg et al., 2014). Le valproate, par exemple, a un très bon effet à court terme sur les crises mais induit des déficits attentionnels plus importants (Glauser et al., 2013).

3.5. Comorbidités

25% des enfants atteints d'EAE présentent des déficits cognitifs, des difficultés de langage, des déficits de l'attention, de l'hyperactivité, de l'anxiété et/ou des troubles de l'humeur (Caplan et al., 2008; Davies et al., 2003; Ott et al., 2003). Il a ainsi pu être mis en évidence que l'EAE est souvent associée à un niveau scolaire plus faible ainsi qu'à des difficultés psychosociales et émotionnelles (Wirrell et al., 1997). Les causes de ces comorbidités pourraient être (i) la répétition des crises, (ii) les processus physiopathologiques menant à la survenue des crises et (iii) les traitements anti-épileptiques. Néanmoins, Glauser

et al. 2010 ont montré que 35% des enfants présentent un trouble attentionnel avant même le début de leur traitement suggérant que les déficits cognitifs sont directement liés à l'EAE et pas uniquement dus à un effet secondaire des traitements.

3.6. Modèles murins d'épilepsie-absence

Pour étudier les mécanismes physiopathologiques, les mutations génétiques et/ou les traitements des pathologies neurologiques, le recours à des modèles animaux apparaît aujourd'hui comme une des stratégies les plus pertinentes.

Plusieurs modèles d'épilepsie-absence ont été développés chez le rongeur afin de mieux comprendre le développement du réseau épileptique et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques qui sont mis en œuvre dans l'EAE. Parmi ces modèles, on peut distinguer les modèles génétiques qui sont spontanés et la plupart du temps polygéniques des modèles transgéniques qui sont eux monogéniques (Jarre et al., 2017a). Parmi les modèles génétiques, deux ont été sélectionnés à partir de rats Wistar : le Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) et le Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS). Ces deux modèles ont largement été étudiés, et préférés notamment aux modèles transgéniques et pharmacologiques, car ils répondent mieux aux critères (i) d'isomorphisme des symptômes, (ii) d'homologie des mécanismes physiopathologiques et (iii) de prédictivité des réponses aux traitements en comparaison à la pathologie humaine (Coenen and Van Luijtelaaar, 1987; Danober et al., 1998; Depaulis et al., 2016).

La principale différence qui existe entre ces deux modèles génétiques d'EAE chez le rat est l'âge de survenue des crises. Elles apparaissent chez le jeune rat (<P30) pour le GAERS (Jarre et al., 2017b) alors qu'elles surviennent chez le rat adulte pour le WAG/Rij (Coenen and Van Luijtelaaar, 1987; Klein et al., 2004; Kole et al., 2007). Par rapport à la pathologie humaine, les deux principales différences des modèles murins sont (i) la fréquence interne des DPO qui est plus élevée chez le rat (8 Hz vs. 3 Hz) et (ii) les DPO qui persistent tout au long de la vie chez les animaux.

Ce travail de thèse s'est appuyé sur l'utilisation du GAERS, c'est pourquoi ce modèle est plus largement détaillé dans les lignes qui suivent.

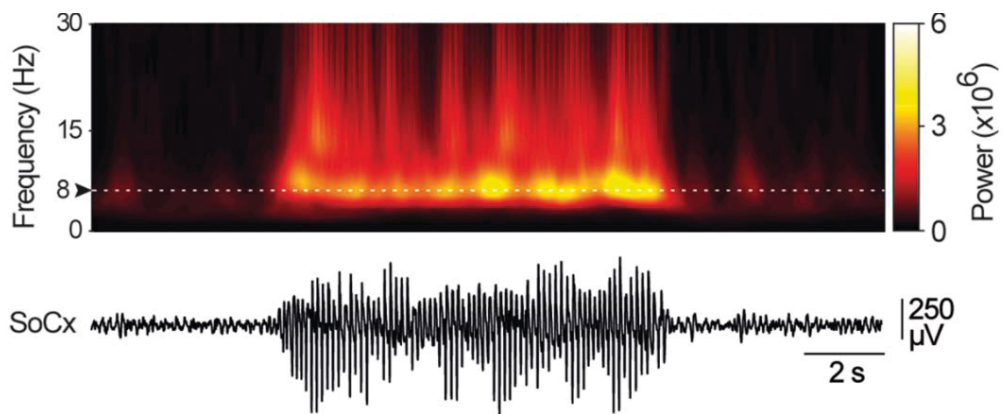


Figure 15: Les crises d'absences chez le GAERS sont caractérisés par des décharges de pointes-ondes à 7-8 Hz (adapté de Jarre et al. 2017).

4. Le GAERS

4.1. Origine et développement

Le rat GAERS est issu de la sélection de rats Wistar qui présentaient spontanément des DPO bilatérales et synchrones au niveau du cortex cérébral lors d'enregistrements EEG dans un état de veille calme. Ces rats ont été croisés entre eux afin d'obtenir, après trois générations, une lignée de rats dont tous les individus présentent des DPO (Danober et al., 1998). De la même manière, les rats Wistar qui ne présentaient pas de DPO ont également été sélectionnés pour générer une lignée consanguine sans crise d'absence : les rats *Non Epileptic Control* (NEC).

D'un point de vue étiologique, une seule mutation génétique a été trouvée chez le GAERS à ce jour (Powell et al., 2009). Elle correspond à une mutation de type gain de fonction sur les canaux calciques à bas seuil CAV3.2 (gène CACNA1H) qui a par ailleurs été retrouvée dans des formes humaines d'épilepsie-absence (Powell et al., 2009). Néanmoins, cette mutation ne permet d'expliquer que 30% du phénotype épileptique ce qui renforce l'aspect polygénique de cette pathologie (Powell et al., 2009).

4.2. Caractéristiques EEG des crises

Les crises apparaissent progressivement chez le GAERS à partir du quinzième jour post-natal (P15) (Jarre et al., 2017b). Cette évolution a été divisée en trois stades : le stade 1 (P15-P22) où les rats présentent une activité oscillatoire corticale anormale, le stade 2 (P25-P40) qui correspond à une activité mixte entre oscillation et DPO et finalement le stade 3 ou stade mature (\geq P40) où les crises présentent une majorité de DPO. Pendant ma thèse, j'ai participé à la caractérisation de ces trois stades et à l'étude de l'épileptogénèse du GAERS (voir Annexe n°2).

Chez l'adulte (stade 3), les crises sont caractérisées par des DPO de 7-8Hz en moyenne. Il est à noter qu'en début de crise, la fréquence interne est entre 10-11Hz et s'abaisse

rapidement pendant les deux premières secondes de décharge (Polack et al., 2007; Pouyatos et al., 2013; Depaulis et al., 2016) (Figure 15). Ces crises durent en moyennes 20-25 secondes avec une crise toutes les minutes lorsque les animaux sont dans des conditions de test, c'est-à-dire dans un état de veille calme (Depaulis et al., 2016). Les crises débutent et se terminent de manière soudaine sur un EEG de base désynchronisé normal.

4.3. Comportement

Les crises chez le GAERS sont associées à un arrêt comportemental durant lequel ont lieu des clonies des muscles de la face, qui se traduisent par un mouvement des vibrisses, ainsi qu'un abaissement progressif de la tête dû à une hypotonie des muscles de la nuque (Depaulis et al., 2016). Le comportement locomoteur reprend son cours dès la fin de la crise.

Afin de vérifier si les comorbidités récemment décrites chez le patient humain (Caplan et al., 2008) étaient également présentes dans les modèles animaux, plusieurs études ont évalué le comportement général des GAERS. Les tests de l'openfield et du labyrinthe en croix surélevé ont montré que les GAERS présentent une hypolocomotion, une hyperanxiété en comparaison aux rats contrôles non épileptiques NEC (Jones et al., 2008; Bouilleret et al., 2009). De plus, un test de préférence au sucrose évaluant l'anhédonie montre une plus faible consommation d'eau sucrée par les GAERS, suggérant un phénotype dépressif (Jones et al., 2008). Néanmoins, la consommation globale des rats n'ayant pas été contrôlée dans cette étude, cette dernière conclusion est à prendre au conditionnel. De plus, lorsque ces tests sont réalisés en comparant le comportement du GAERS à celui des rats Wistar, le GAERS ne montre plus de trait d'anxiété ni de défaut de locomotion (Vergnes et al., 1991; Marques-Carneiro et al., 2014) ce qui souligne l'importance des contrôles.

4.4. Traitements et développement thérapeutique

Les crises du GAERS sont extrêmement stéréotypées avec une grande homologie et prédictivité par rapport à la pathologie humaine. Notamment, le GAERS répond parfaitement

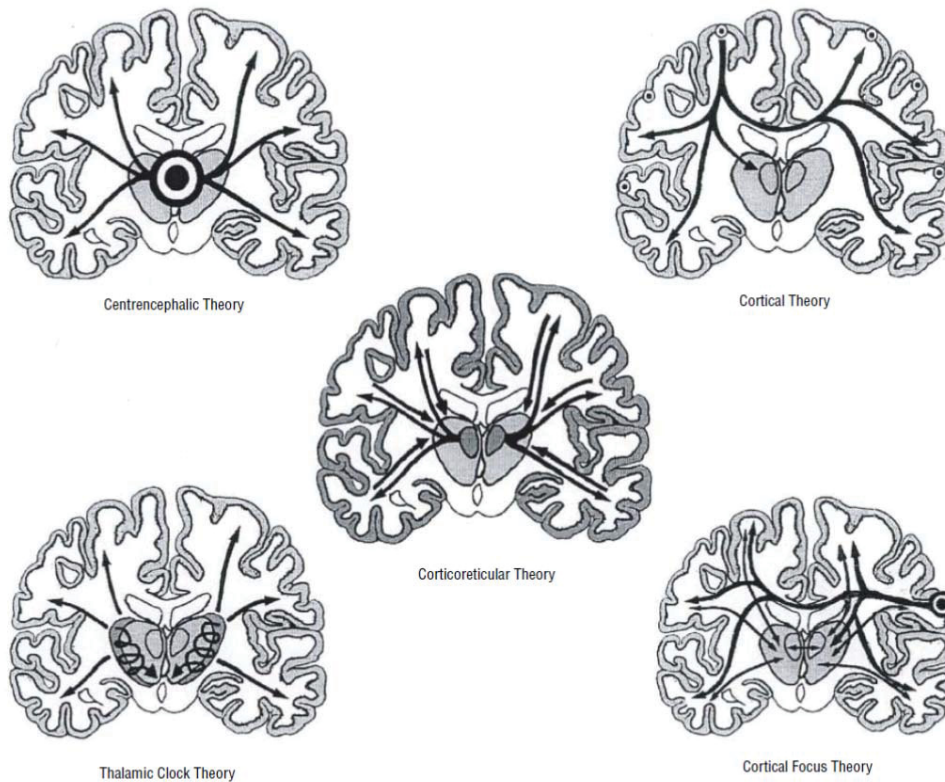


Figure 16: Schéma récapitulant les différentes théories qui se sont succédées concernant le site initiateur des crises d'absences. (Meeren et al. 2005)

aux traitements antiépileptiques classiques de l'épilepsie-absence (Depaulis et al., 2016). C'est pourquoi ce modèle est largement utilisé pour des tests pharmacologiques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que la stimulation intracérébrale profonde (Vercueil et al., 1998; Feddersen et al., 2007; Kahane and Depaulis, 2010) ou encore la radiochirurgie des épilepsies focales (Pouyatos et al., 2013; Studer et al., 2015; Pouyatos et al., 2016). En effet, même si l'EAE n'est pas une cible thérapeutique de choix puisqu'elle est bien prise en charge aujourd'hui par les médicaments antiépileptiques, les modèles génétiques permettent de réaliser des preuves de concept précliniques pour de nouvelles thérapies.

Lors de ma thèse, j'ai participé au développement de l'utilisation du rayon-x synchrotron pour le traitement par radiochirurgie de foyers épileptiques, ce qui m'a conduit à écrire une revue publiée en 2015. Cette revue résume d'une part l'intérêt d'une telle approche dans le traitement et la compréhension des circuits épileptiques mais aussi l'intérêt d'utiliser le GAERS dans de telles études (voir Annexe 1).

5. Origine des crises d'absence

5.1. Evolution des théories : entre cortex et thalamus et vice versa

La recherche de la zone d'initiation des DPO a vu se succéder plusieurs théories depuis 1940 (Figure 16) (Meeren et al., 2005). La première théorie repose sur la caractéristique principale des crises d'absence à savoir la présence de DPO bilatérales et synchrones observées sur les enregistrements EEG de patients. Penfield a émis l'hypothèse que, si les DPO sont présentes en même temps au niveau des cortex des deux hémisphères, alors elles doivent avoir une initiation sous-corticale médiée par une structure contrôlant le cortex tel que le thalamus : **théorie centrencéphalique** (Penfield, 1952). En effet, lorsqu'on stimule le thalamus intralaminaire à 3Hz, on peut occasionnellement observer des DPO bilatérales à 3Hz au niveau du cortex chez l'Homme. Cependant, des expériences chez le patient montrent que

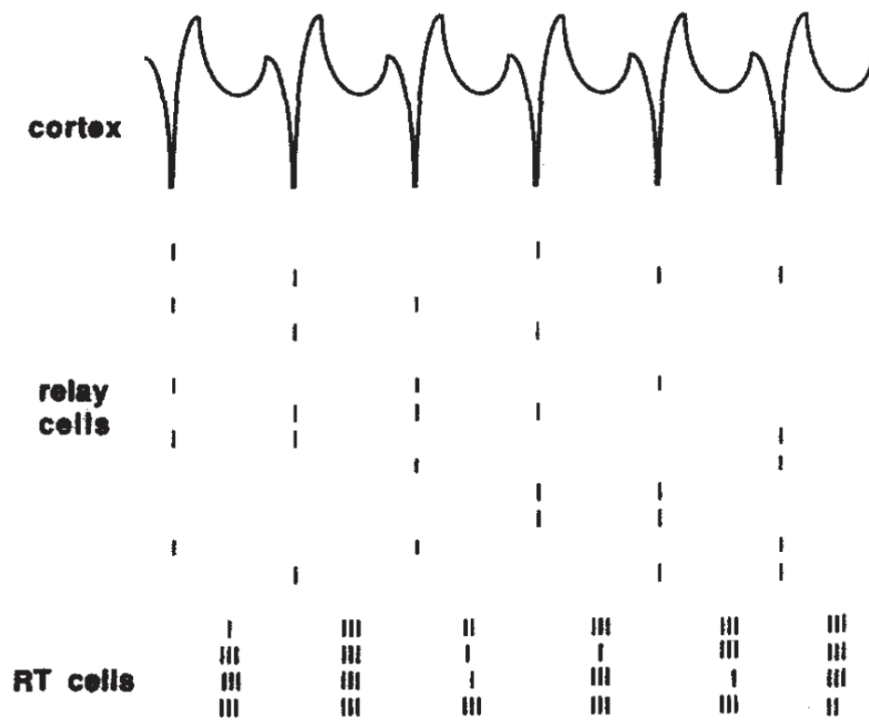


Figure 17: Théorie thalamique de génération des crises d'absence. (Buzsaki et al. 1995)

la levée d'inhibition par application locale au niveau du cortex de pentylènetétrazol, un antagoniste du GABA, permet la génération de DPO alors que ce n'est pas le cas lors de l'application de la même drogue au niveau du thalamus. De plus, des enregistrements profonds montrent que le départ des DPO peut se faire à proximité de lésions au niveau cortical. Ces arguments ont conduit à la **théorie corticale** (Lüders et al., 1984; Meeren et al., 2005). Cette théorie suggère également que les crises d'absences peuvent être secondaires à une atteinte structurelle du cortex. La **théorie corticoréticulaire** est basée sur le modèle où les DPO sont induites chez le chat par l'application de pénicilline. Cet antagoniste des récepteurs GABA_A provoque des DPO lorsqu'il est appliqué sur le cortex alors que ce n'est pas le cas lorsqu'il est injecté dans le thalamus. Ainsi, lorsque le cortex est dans un état d'hyperexcitabilité, il répondrait aux influx thalamiques par la génération de DPO au lieu des *spindles* (Avoli and Gloor, 1981). Selon cette théorie, le cortex et le thalamus, et tout particulièrement le noyau réticulé (nRT), sont impliqués dans la génération des DPO. Cette même analogie aux *spindles* va poser les fondements de la **théorie de l'horloge thalamique** énoncée par G. Buzsáki en 1991. Selon cette théorie, c'est le noyau réticulé du thalamus qui va orchestrer la génération des DPO. Ainsi, suite à une bouffée inhibitrice du nRT sur les neurones thalamo-corticaux (TC), ceux-ci sont activés par rebond et de façon simultanée ce qui entraînerait une activation massive du cortex. Selon cet auteur, l'initiation des DPO serait liée à une anomalie au sein de la boucle entre le nRT et les TC. Cette théorie s'appuie sur des enregistrements multi-unitaires qui montrent une activation des TC et des neurones corticaux pendant la pointe et suggèrent une activation des neurones du nRT qui joueraient le rôle de pacemaker pendant l'onde (Figure 17) (Buzsáki, 1991). De plus, des analyses de détection de source ou *Current Source Density* (CSD) montrent que les pointes-ondes présentent une source en couche 4, suggérant ainsi un rôle prépondérant des afférences thalamiques dans la propagation corticale des décharges de pointes ondes (Kandel and Buzsáki, 1997). Le fait que des lésions du nRT suppriment les crises chez le GAERS (Avanzini et al., 1992) et que les neurones thalamo-corticaux déchargent avant les cellules corticales aussi bien chez le GAERS (Seidenbecher et al., 1998) que chez le WAG/Rij (Inoue et al., 1993) étaient en faveur de cette théorie. Cependant, la principale limite de ce schéma d'initiation thalamique des DPO est de comprendre comment les neurones du nRT sont activés (Buzsáki, 1991). La **théorie du foyer cortical** pour laquelle c'est le cortex qui initie les DPO alors que le thalamus sert de relais afin

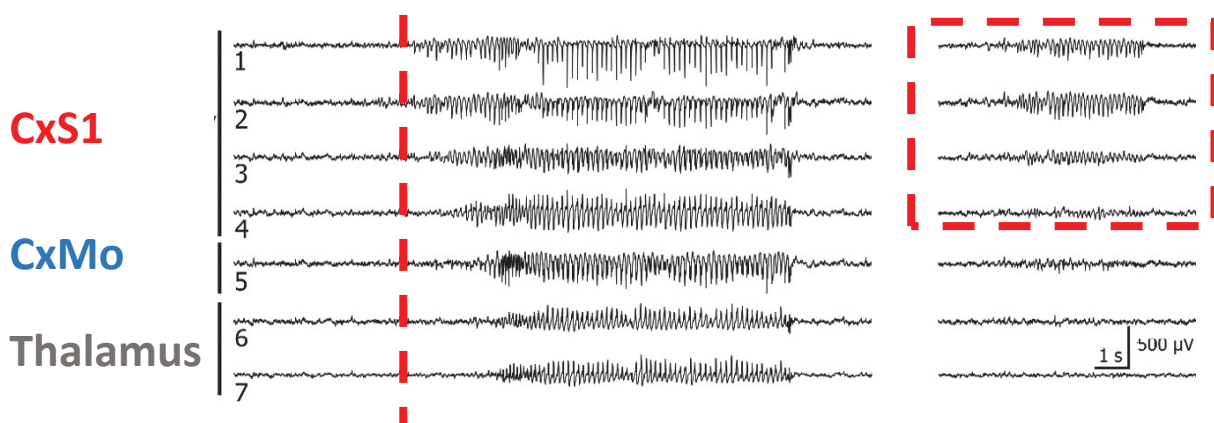


Figure 18: Chez le GAERS, les décharges de pointe ondes sont générées dans le cortex somatosensoriel primaire puis se propagent au cortex moteur et enfin au thalamus (gauche). De plus, des DPO ont pu être observées uniquement au sein du CxS1, sans propagation au reste de l'encéphale (droite) (adapté de Polack et al. 2007)

d'amplifier et de propager l'activité paroxystique à l'ensemble du cortex a été proposée suite à des enregistrements EEG multi-sites chez le WAG/Rij (Meeren et al., 2002, 2005).

Ces différentes théories sur la génération des crises d'épilepsie-absence s'accordent sur le fait que, dans la génération des DPO, le cortex et le thalamus sont communément impliqués. C'est bien le rôle respectif de ces deux structures qui a animé les débats pendant près de 70 ans et la solution provient de l'enregistrement simultané de l'activité de ces deux structures.

5.2. Le foyer cortical

La théorie du foyer cortical à l'origine de la génération des DPO a été démontrée grâce à des enregistrements électroencéphalographiques, électrophysiologiques et par l'utilisation d'imagerie cérébrale chez le WAG/Rij et le GAERS.

Premièrement, l'existence d'un foyer cortical a été suggérée par l'enregistrement simultané du cortex et du thalamus. Chez le GAERS, les neurones du cortex déchargent avant ceux du nRT et du thalamus ventrobasal pendant la formation des DPO (Pinault et al., 2001). Chez le WAG/Rij, les DPO du cortex précèdent systématiquement celles du thalamus pendant les 500 premières millisecondes de la crise (Meeren et al., 2002). Au sein du cortex, grâce à une analyse de corrélation non-linéaire, il a été suggéré que le foyer des DPO est localisé au niveau du cortex somatosensoriel primaire (Meeren et al., 2002). Cette localisation a été confirmée par des enregistrements multiples en potentiel de champs locaux (ang. *Local field potential*, LFP) chez le GAERS où les DPO apparaissent dans le cortex somatosensoriel 1 seconde (s) avant le cortex moteur et 1,3 s avant le thalamus ventrobasal (Polack et al., 2007, 2009b) (Figure 18). La présence de DPO courtes uniquement au niveau du cortex S1 renforce cette théorie du foyer cortical (Polack et al., 2007). Parallèlement à ces études électrophysiologiques, il a été démontré que le cortex S1 présente une activation 5,5 ms avant le thalamus en IRMf (David et al., 2008). Par ailleurs, l'inactivation pharmacologique ou lésionnelle du cortex S1 réduit l'excitabilité des neurones de cette région et prévient la survenue des DPO (Polack et al., 2009; Pouyatos et al., 2013).

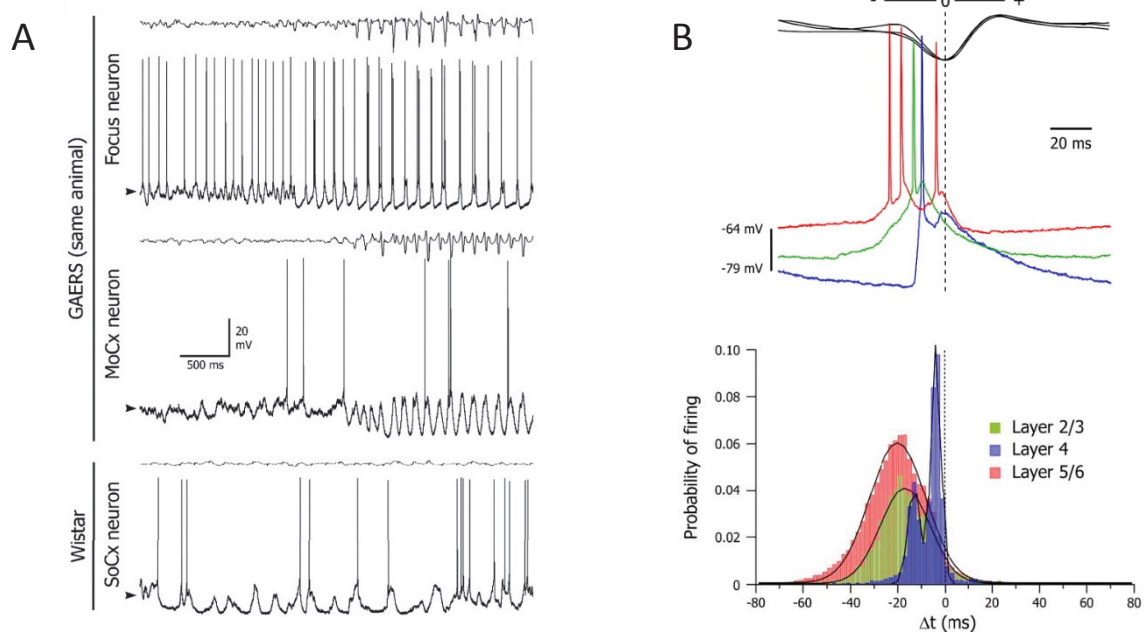


Figure 19: (A) Les neurones des couches profondes du S1Cx chez le GAERS présentent une hyperactivité et une hyperexcitabilité par rapport aux neurones du cortex moteur ou à ceux du S1Cx de rats wistar. (B) Lors de la pointe, les neurones des couches profondes déchargent avant ceux des couches 2/3 et des couches 4 (adapté de Polack et al. 2007)

L'analyse plus précise d'enregistrements multisites LFP dans le cortex somatosensoriel primaire a permis de préciser la localisation du foyer cortical. En effet, ce sont les électrodes situées dans la partie antérieure du S1 et qui code pour les vibrisses (S1Bf) qui enregistrent les DPO en premier (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007) ce qui est confirmé par des stimulations où les potentiels évoqués somatosensoriels (ang. *Sensory evoked potential*, SEP) coïncident systématiquement avec le foyer (Meeren et al., 2002).

Ces résultats obtenus chez le rongeur sont cohérents avec les données de plus en plus nombreuses chez l'homme qui indiquent une origine corticale des DPO et plus précisément une initiation au niveau du cortex frontal (Holmes et al., 2004; Le Van Quyen et al., 2006; Tucker et al., 2007; Bai et al., 2010).

5.3. Le circuit de génération des crises dans le S1Bf

Après l'identification du cortex somatosensoriel primaire comme foyer de génération des décharges de pointes-ondes chez le GAERS et le WAG/Rij, la question a été de préciser, au sein du cortex à tonneaux, les mécanismes de génération et de propagation de l'activité paroxystique.

L'enregistrement de l'activité des neurones des différentes couches du cortex S1 en même temps que la DPO de surface a permis de proposer un circuit de génération de la crise à l'échelle de la colonne corticale (Depaulis and Charpier, 2017). Ainsi, les neurones excitateurs des couches profondes (L5/6) s'activent en premier et déchargent 20 ms avant le pic de la pointe (Pinault, 2003; Polack et al., 2007, 2009b; Chipaux et al., 2011). Ils sont suivis par les neurones pyramidaux des couches 2/3 à -16 ms et finalement par les neurones excitateurs de la couche 4 de manière bimodale à -13 et -4 ms (Polack et al., 2007) (Figure 19). Au niveau du thalamus, les neurones du nRT et des noyaux ventrobasaux s'activent en moyenne près de 10 ms après les neurones des couches 5/6 du cortex (Pinault, 2003; Polack et al., 2007). D'autre part, les neurones pyramidaux des couches profondes du cortex moteur

s'activent 6 ms avant le pic de la pointe soit près de 12 ms après leurs homologues du S1Bf (Polack et al., 2009).

En ce qui concerne les interneurons GABAergiques, ils s'activent en moyenne 8 ms après les neurones pyramidaux des couches profondes (Chipaux et al., 2011). Ces neurones ne joueraient pas un rôle actif dans la génération des DPO mais permettraient le contrôle des neurones initiateurs des crises (neurones pyramidaux des L5/6) et la restriction de leur activation dans le temps par l'intermédiaire de boucle de type *feed back inhibition* (Chipaux et al., 2011; Depaulis and Charpier, 2017).

Ainsi, le circuit de génération des DPO semble impliquer les neurones glutamatergiques du S1Bf dans l'ordre suivant : L5/6→L2/3→L4. Le rôle prépondérant des neurones des couches profondes est cohérent avec leurs caractéristiques électrophysiologiques. En effet, ces neurones présentent une activité spontanée interictale plus importante associée à un potentiel de membrane plus élevé par rapport aux mêmes neurones enregistrés dans le cortex moteur du GAERS ou dans le S1Bf des Wistar (Polack et al., 2007, 2009b; Chipaux et al., 2013; Williams et al., 2016) (Figure 19). De plus, ces neurones pyramidaux des couches profondes ont une susceptibilité plus importante à décharger en bouffée que chez les rats contrôles (Williams et al., 2016). Pour toutes ces raisons, ces neurones sont dit « ictogènes » et joueraient un rôle d'initiation dans la génération des DPO (Polack et al., 2007; Depaulis and Charpier, 2017).

De manière intéressante, ces neurones ictogènes, localisés dans la zone du cortex qui gère l'information sensorielle médiée par les vibrisses, semblent toujours capables d'intégrer l'information provenant de la périphérie. En effet, lors de stimulation des vibrisses, aucune différence de potentiel évoqué n'a pu être observée dans le S1Bf que ce soit en termes de latence ou d'amplitude et quel-que-soit l'état de vigilance de l'animal (critique vs. intercritique) (Chipaux et al., 2013). Néanmoins, on ne peut pas exclure l'existence d'un lien entre le circuit physiologique de transmission sensorielle et le circuit pathologique de génération de DPO. Par exemple, une étude réalisée chez le WAG/Rij a montré que la déprivation sensorielle par élimination des vibrisses pendant la première semaine de vie chez le raton entraîne une augmentation du nombre et de la durée des crises chez le rat adulte ainsi qu'un âge de survenue plus précoce (Sitnikova, 2011).

Ainsi, les neurones des couches profondes du cortex somatosensoriel primaire chez le GAERS initieraient la génération des DPO. Cette activité paroxystique se propage ensuite aux couches superficielles puis aux neurones des couches 4 dans le S1Bf. La génération et la propagation de l'activité épileptique semblent donc se faire à travers un circuit cortical différent de celui de la propagation de l'activité sensorielle (L4→L2/3→L5/6) même s'il implique les mêmes acteurs/neurones. De plus, ce circuit d'hyperexcitation semble être contrôlé de manière locale par les interneurons qui contraignent temporellement la décharge des neurones excitateurs (Depaulis and Charpier, 2017).

En résumé, l'épilepsie-absence est une pathologie polygénique caractérisée par des DPO associées à un arrêt comportemental. La compréhension des mécanismes de génération des crises a été rendue possible grâce à l'utilisation de modèles murins hautement prédictifs de la pathologie humaine et stéréotypés.

L'EAE est une pathologie de la boucle thalamo-corticale où le cortex hyperexcitable joue un rôle d'initiation de l'activité paroxystique et le thalamus permet l'amplification et le relai des DPO notamment grâce aux caractéristiques des décharges et de l'interconnexion du nRT et des noyaux ventrobassaux. Cette activité générée localement va également pouvoir se propager de manière stéréotypée au reste du cortex ipsi- et contro-latérale par le corps calleux et les connexions cortico-corticales internes.

Objectifs de la thèse

Un des objectifs centraux en épileptologie est de comprendre la mise en place et le fonctionnement des réseaux de neurones qui génèrent les crises. En effet, la compréhension de ces mécanismes permettrait d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. Une des hypothèses centrales est que les réseaux neuronaux qui sous-tendent la génération des crises se caractériseraient par des anomalies de communication et donc de connexion entre les neurones qui favoriseraient leur synchronisation pathologique (Uhlhaas and Singer, 2006). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les décharges de pointes-ondes (DPO) de l'épilepsie-absence sont initiées au niveau du cortex. Cependant, on ne connaît encore que peu de choses sur les particularités des réseaux épileptiques et sur les circuits neuronaux qui les composent.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse a été de comprendre le rôle de la connectivité corticale dans le fonctionnement du réseau de génération des crises d'épilepsie-absence (EA). Pour cela, nous avons utilisé un modèle génétique et spontané d'EA chez le rat, le GAERS. Dans ce modèle, présenté en introduction (§4 de la partie Epilepsie), la région initiatrice des crises a été identifiée au sein du cortex somatosensoriel primaire (S1), ce qui nous a permis de poser deux questions :

- Est-ce que le réseau de neurones qui initie les DPO chez le GAERS présente une anomalie de connectivité ?
- Si une anomalie de connectivité existe au sein du réseau qui génère les DPO, est-ce qu'elle interfère avec le fonctionnement physiologique de ce réseau ?

Nous avons ainsi étudié le circuit de génération des DPO et l'interférence éventuelle avec l'activité physiologique à l'aide de différentes approches méthodologiques fonctionnelles et structurelles.

Le premier objectif a été de comprendre le rôle de la connectivité neuronale du cortex S1 dans la génération des DPO chez le GAERS. Nous avons fait l'hypothèse que la génération

des DPO serait sous-tendue par un circuit neuronal pathologique présentant une organisation et/ou une connectivité différente de celle d'un animal non épileptique. Pour vérifier cette hypothèse nous avons tracé les connexions neuronales dans les couches supragranulaire et infragranulaire du S1Bf chez le GAERS et nous les avons comparées à celles de rats contrôles Wistar. Nous avons ensuite cherché à interférer avec la connectivité pathologique en les lésant par microfaisceau synchrotron afin de comprendre leur rôle dans l'initiation des DPO. Nous avons ainsi étudié les conséquences anatomiques de ces transections par microfaisceaux synchrotron et mesuré leurs effets fonctionnels en réalisant un suivi de l'activité LFP sur des animaux vigiles puis par des enregistrements *in vivo* LFP et MUA des différentes couches corticales à l'aide d'électrodes multi-canaux chez l'animal immobilisé.

Notre second objectif a été de comprendre dans quelle mesure le circuit pathologique de génération des DPO au sein du S1 chez le GAERS, interférait avec le rôle physiologique du même réseau neuronal. Nous avons ainsi étudié la capacité de traitement des stimuli sensoriels des vibrisses du GAERS. Pour cela, nous avons d'une part utilisé un test de discrimination de texture chez l'animal vigile et, d'autre part, nous avons caractérisé les potentiels évoqués sensoriels au niveau cortical par application de bouffées d'air sur les vibrisses chez l'animal immobilisé. D'autre part, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure le traitement de l'information sensorielle se faisait de la même manière que chez le rat non-épileptique en étudiant l'activité LFP et MUA des différentes couches corticales enregistrés *in vivo* à l'aide d'électrodes multi-canaux suite à l'application de bouffées d'airs sur les vibrisses.

Résultats

Article 1

Connectivity of somatosensory cortex deep layer neurons drives neuronal pathological synchronization during absence seizure

F Studer, G Jarre, B Pouyatos, E Brauer-Krisch, F Estève, C Heinrich,
R Serduc and A Depaulis.

Manuscrit en préparation

Introduction

Le cortex est une structure hautement organisée structurellement et fonctionnellement. Structurellement, on note que les neurones, qui présentent des points communs morphologiques et neurochimiques, sont disposés en couches cellulaires parallèles à la surface du cerveau. Fonctionnellement, il a été montré que les neurones qui partagent une même fonction sont organisés en réseaux fonctionnels qui, au niveau du néocortex, peuvent prendre la forme d'une colonne perpendiculaire à la surface du cerveau (Mountcastle, 1957). Ces réseaux fonctionnels s'organisent entre les neurones grâce à une connectivité stéréotypée qui se met en place pendant le développement et qui dépend de facteurs intrinsèques (i.e. programme génétique) et extrinsèques (i.e. environnement, expérience, stimulation) (Feldmeyer et al., 2013). Au niveau du cortex somatosensoriel à tonneaux des rongeurs, ces réseaux fonctionnels prennent la forme de colonnes qui présentent la même somatotopie que celle des vibrisses au niveau du museau (Woolsey and Van der Loos, 1970). Au sein de ces colonnes, l'information sensorielle suit un circuit classique dit canonique (Douglas et al., 1989; Feldmeyer et al., 2013) qui est régi par des connexions neuronales favorisant le transfert de l'information sensorielle (Lefort et al., 2009).

L'épilepsie est une pathologie caractérisée par la récurrence de crises liée à une synchronisation neuronale pathologique. L'épilepsie-absence (EA) est une forme prototypique d'épilepsie génétique caractérisée par des décharges de pointes-ondes (DPO) bilatérales et synchrones concomitantes à une altération de la conscience (Loiseau et al., 1995). Diverses anomalies en termes de connectivité neuronale, structurelle ou fonctionnelle, ont été rapportées en EA comme dans d'autres syndromes épileptiques aussi bien chez l'Homme que dans des modèles animaux (Epsztein et al., 2005; Bai et al., 2011; Feldt Muldoon et al., 2013; Yan and Li, 2013). Pour l'EA, il existe notamment un modèle génétique chez le rat, le GAERS, où il a été montré que les DPO sont initiées au sein du cortex S1 (pour revue voir Depaulis et al., 2016).

L'objectif de cette étude a été de confirmer (i) le site d'initiation ainsi que (ii) le circuit de génération des DPO au sein du S1 et (iii) de comprendre si ces DPO sont liées à une anomalie de connectivité qui permettrait d'expliquer l'hypersynchronisation pathologique à l'origine de l'activité paroxystique.

Les irradiations synchrotron ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de François Estève au GIN et la ligne biomédicale (ID17) de l'ESRF.

Manuscrit

Connectivity of somatosensory cortex deep layer neurons drives neuronal pathological synchronization during absence seizure

Florian Studer^{1,2}, Guillaume Jarre^{1,2}, Benoit Pouyatos³, Elke Brauer-Krisch⁴, François Estève^{1,5}, Christophe Heinrich⁶, Raphael Serduc^{1,5} and Antoine Depaulis^{1,2,5}.

¹ Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France

² Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France

³ INRS, F-54519 Vandoeuvre Les Nancy, France

⁴ Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility, ESRF, F-38000 Grenoble, France

⁵ CHU de Grenoble, F-38000 Grenoble, France

⁶ Stem-cell and Brain Research Institute, SBRI, Inserm U1208, F-69000 Lyon, France

Correspondence: antoine.depaulis@univ-grenoble-alpes.fr

Highlights:

- Absence seizures in GAERS arise from the S1Bf cortex
- SWD are initiated in the S1Bf through a L5/6→L2/3→L4 circuit
- GAERS deep layer S1Bf neurons are hyperconnected
- GAERS have an increased inhibitory connection from L5/6 to L2/3 in the S1Bf
- Deep layer horizontal connections are critical in the neuronal synchronization during absence seizures

Key words: somatosensory cortex, absence epilepsy, cortical circuits, synchrotron, neuronal synchronization, cortical connectivity

Introduction:

The neocortex is one of the most organized structure of the brain with a density of neurons that outlines six cortical layers which are parallel to the skull surface. In the primary somatosensory cortex (S1), which is involved in perceptual sensory coding (Feldmeyer et al., 2013; Harris and Mrsic-Flogel, 2013), neurons from the different layers are organized in cortical columns that form functional units (Mountcastle, 1957; Woolsey and Van der Loos, 1970). In particular, in the barrel field of rodents (S1Bf), each column receives information from one whisker conferring to this area a fine somatotopic organization (Woolsey and Van der Loos, 1970). The sensory information flows from the vibrissae to the S1Bf *via* the ventrobasal thalamus. In the cortex, the sensory information is processed through a canonical circuit allowing the transfer of sensory information inside one column (Douglas et al., 1989; Lübke and Feldmeyer, 2007) and is modulated by local microcircuits composed of both excitatory and inhibitory neurons (Wilent and Contreras, 2005). These circuits are highly stereotyped in the neocortex and are progressively built up during brain maturation (Bureau et al., 2004; van der Bourg et al., 2016). S1Bf structural and functional connectivity has been extensively studied in physiological conditions in rodent S1Bf (Bureau et al., 2004; Shepherd and Svoboda, 2005; Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015; Schnepel et al., 2015; Narayanan et al., 2015). However, this neuronal connectivity can be impaired in pathological conditions as described in epilepsy (Epsztein et al., 2005; Feldt Muldoon et al., 2013; Yan and Li, 2013; Althaus et al., 2016).

Epileptic seizures are characterized by the hypersynchronization of a group of neurons (Uhlhaas and Singer, 2006) that may result from an increased connectivity between neurons involved in their generation (Yan and Li, 2013). In absence epilepsy (AE), a prototypic form of genetic epilepsy (Depaulis et al., 2016; Jarre et al., 2017a), seizures are “generalized”, *i.e.*, they spread rapidly and bilaterally over most cortical areas and several subcortical structures (Loiseau et al., 1995; Berg et al., 2010). The generator of spike-and-wave discharges (SWDs), the hallmark of absence seizures, has been shown to be located in the frontal part of the cortex in human (Holmes et al., 2004; Le Van Quyen et al., 2006; Tucker et al., 2007; Bai et al., 2010; Yan and Li, 2013) and in the S1 in two genetic rat models, the GAERS (Polack et al., 2007; David et al., 2008; Polack et al., 2009; Pouyatos et al., 2013; Jarre et al., 2017b) and the WAG/Rij (Meeren et al., 2002; Nersesyan et al., 2004). In the GAERS, we demonstrated that

pyramidal neurons of the deep layer of the S1 play a leading role in SWD generation and proposed them as "ictogenic" neurons (Polack et al., 2007; Depaulis and Charpier, 2017). Indeed, GAERS L5/6 neurons in the S1 present properties of an increased excitability such as a more depolarized membrane potential and an increased firing rate during interictal periods. Most of all, their firing consistently precedes that of neurons located in other layers during SWDs. Yet, our knowledge of the neuronal connectivity abnormalities in AE and particularly within the S1 circuits in the GAERS remains insufficient to explain the rapid generation and spread of SWDs within the cortex.

Here, we addressed the possibility that an abnormal structural connectivity could underlie the hypersynchronization that allows SWDs generation and propagation within the cortex of adult GAERS. To this aim, we used (i) a Rabies Virus (RABV) monosynaptic retrograde tracing based method (Wickersham et al., 2007; Miyamichi et al., 2011; Deshpande et al., 2013; Tovote et al., 2016) to investigate S1Bf structural connectivity in GAERS rats, (ii) electrophysiological recordings using multisite silicon-probes and (iii) synchrotron-generated microtransections to interfere with cortical connections. To our knowledge, we provide for the first time evidence for (i) a seizure-generating cortical circuit and (ii) the existence of a structural hyperconnectivity among S1Bf deep layer neurons that is critical for neuronal synchronization that leads to seizure generation and propagation in AE.

Material and methods

Animals and Ethics approval

Adult GAERS male rats (250-350 g) of the Grenoble colony and age-matched control Wistar rats were used to perform these experiments. They were maintained with food and water *ad libitum* in a 12:12h light dark cycle with light on at 7:00 am. All protocols were approved by local Ethical Committees (Ethax and Grenoble Institute of Neuroscience) and the French Ministry of Research, and experiments were carried out in accordance with European Union guidelines (directive 2010/63/EU).

Local field potential recordings in freely-moving rats

Electrodes implantation. For chronic Local Field Potential (LFP) recordings, GAERS rats were stereotaxically implanted in the S1Bf with bipolar electrodes (Enamelled copper wire, \varnothing 220 μ m, Block, Verden, Germany) while anesthetized with a mixture of xylazine (5-10 mg/kg i.p.; Rompun[®], Centravet, Dinan, France) and ketamine (40-100 mg/kg i.p.; Clorketam1000[®], Vetoquinol, Centravet, Dinan, France). Incisions and compression points were infiltrated with lidocaine (2%; Centravet, Dinan, France). Stereotaxic coordinates were antero-posterior from bregma (AP): -2.5 mm; medio-lateral (ML): -5.5 mm; dorso-ventral (DV): -2.5 mm (Paxinos and Watson, 2007). A stainless-steel screw (\varnothing 1mm) inserted over the cerebellum served as a reference electrode. All electrodes were soldered to a female microconnector (BLR150Z; Fischer Elektronik, Lüdenscheid, Germany) and secured on the animals' head with dental cement.

Video-LFP recordings. After a post-surgery recovery period of one week, LFP were acquired from awake freely-moving rats with a digital acquisition system (Coherence 3NT, Deltamed, Paris, France) with a sampling rate of 1,024 Hz and an analog bandpass filtering between 1 and 256 Hz, synchronized with video. Rats were recorded for at least 60 min every other week from 2 weeks after synchrotron irradiation and up to 2 months. The occurrence of cortical discharges on LFP recordings was always confirmed with the video to distinguish epileptiform events from physiological activity patterns associated with sleep, exploratory behaviour or grooming. At the end of experiments, animals were killed with an overdose of pentobarbital (200 mg/kg i.p.) and brains were removed, frozen at -40°C in isopentane and cut in coronal sections for histological processing to verify electrodes location.

LFP signal analysis. Time-frequency and spectral analysis of cortical discharges were performed using an in-house Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) toolbox for Morlet wavelet transforms of intracortical LFPs as previously described (Pouyatos et al., 2016). Briefly, for each SWD, time-frequency analysis of SWDs power were performed between 4 and 20Hz with a 0.1 Hz step. The mean baseline power was used to normalize individual SWDs in amplitude. The time axis of the time-frequency chart was linearly rescaled to realign the start and end of SWDs with a time resolution of 0.1s to allow statistical analyses of signal in the time-frequency plane over all SWDs duration (Pouyatos et al., 2016). Fast-Fourier Transforms

(FFT) of interictal signal were computed and the FFT amplitude was averaged in each frequency band.

Flex MEA and silicon probes recordings

Surgery. GAERS rats were initially anesthetized for surgery with ketamine and xylazine, as mentioned above, and then immobilized with D-tubocurarine hydrochloride pentahydrate (0.4mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and artificially ventilated. They were maintained in a sedated state by repeated injections of fentanyl (1 μ g/kg, i.p.; Janssen-Cilag, Issy les Moulineaux France). This preparation allows the recording of immobilized GAERS in a quiet-wakefulness state prone to SWD occurrence and similar to what is observed when they are freely moving (see Depaulis et al., 2016 for a complete description of this preparation). A large craniotomy was done over the S1 cortex to allow the insertion of either a flex MEA (32 channels, Multichannel System, Reutlingen, Germany) subdurally (n=4) or linear silicon probes (16 channels, 15 μ m site \emptyset , 150 μ m inter-site distance; Neuronexus technologies, Ann Arbor, MI, USA) (n=10). The insertion depth of the silicon probes was controlled through a micromanipulator. Post-hoc detection of polarity reversion in infragranular layers (Kandel and Buzsáki, 1997) associated with Dil application on the back of the probes was used to assess the location of each recording sites in the different cortical layers. During linear silicon probes recordings, a tin electrode was also positioned on the dura within the boundaries of the craniotomy, near the silicon probe, to record S1Bf ECoG activity. For FlexMEA recordings, LFP was amplified through a miniature preamplifier (MPA32, Multichannel System, Reutlingen, Germany). For linear silicon probes recordings, signal was amplified through two miniature preamplifiers (MPA8i, Multichannel System, Reutlingen, Germany). For both types of electrodes, the preamplifiers were connected to a 32-channel programmable gain amplifier (PGA-32, voltage gain, x200 Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany) and sampled at 5 kHz for FlexMEA and 20 kHz for linear silicon probes (16 bit ADC). Recordings were collected on a personal computer *via* a CED interface (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) using the Spike 2 software.

Sensory evoked potentials (SEP). Sensory responses were evoked by air-puffs (50 ms) timed by a pressure device (PMI-200, Dagan, Minneapolis, MN, USA) and delivered to the contralateral

whiskers. Air-puffs, which deflected four to eight whiskers by ~ 10 degrees (Mahon and Charpier, 2012; Chipaux et al., 2013), were applied 60–100 times every 0.24 Hz. At the beginning of each experiment, the orientation and pressure (10-20 psi) of the air puff was adjusted for each experiment to generate a SEP of maximal amplitude.

Signal analysis

FlexMEA signal was analyzed using an in-house Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) toolbox. SWDs were extracted from the raw signal and the h^2 coefficient of non-linear correlation was calculated (Lopes da Silva et al., 1989; Meeren et al., 2002; Wendling et al., 2001, 2009) for each electrode to estimate the strength of the association between all pairs of electrodes and plot on color-coded maps.

Silicon probes raw signal was bandpass filtered (0.1-100Hz) and analyzed via custom-written Matlab scripts. Current source density (CSD) analysis was performed to detect extracellular sources and sinks in S1Bf layers. CSD was computed on each recording site as the second spatial derivative (Nicholson and Freeman, 1975). Multi-unit activity (MUA) was detected as negative event ≥ 2 SD of the baseline on the passband filtered trace (0.6-6kHz). LFP and MUA analysis were done using custom-written Matlab scripts and the Spike2 software (CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Rabies virus neuronal connectivity tracing

The rabies virus is pseudo-typed with the EnvA avian protein, that is specific to the TVA receptor, and G-protein deleted. The RABV tracing method is based on the EnvA/TVA pseudo-typing and the G trans-complementation (Callaway and Luo, 2015) that allow to restrict the subsequent retrograde tracing. EnvA expression will constrain RABV infection only in TVA expressing neurons and G will allow the spread of RABV to the first-order pre-synaptic partner.

Surgery. Rats were anesthetized as previously described with mixed ketamine and xylazine and stereotactically injected in the S1Bf (AP: -2; ML: 5.5 mm from bregma; DV: -0.25 mm from brain surface for L2/3 neurons targeting; DV: -1.8 mm from brain surface for L5/6 targeting) with a lentivirus encoding TVA, G and GFP (LV-pBoB-HTB, Salk Institute, titer: 5×10^{10} /ml, 120nL, 30nL/min) with a glass micropipette controlled by a nanoinjector (NanoLiter 2010, WPI, Sarasota, FL, USA) (Figure 2A). After injection, the micropipette was left in place for 5 min. This

first injection allowed to restrict the subsequent retrograde tracing only from the S1Bf. 14 days later, the same animals were anesthetized with the same protocol and stereotactically injected, as for LV, with a modified rabies virus (EnvA-G-deleted-RabiesmCherry, Salk Institute, titer: 1.3×10^9 /ml, 120nL, 30nL/min), pseudo-typed with the EnvA, deleted for the glycoprotein G and encoding mCherry (Figure 2A). Seven days later, animals were euthanized and their brain collected for analysis as described above.

Retrograde tracing analysis. Only animals with a majority (>50%) of starter cells (i.e. co-infected cells: expressing both GFP and mCherry) located in the targeted cortical cell layer, i.e. L2/3 or L5/6, were kept for analysis. The location of presynaptic partners was listed every 2 brain sections. The connectivity quantification is expressed as the ratio of the number of presynaptic neurons (mCherry+), in a cell layer of S1Bf or more distant brain areas, over the total amount of starter cells (GFP+/mCherry+).

Immunohistochemistry

Slice preparation and staining. Animals were euthanized with an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with PBS followed by 4% PFA. The brains were then removed from the skull, postfixed (4% PFA, 4°C, overnight), cryoprotected (30% sucrose, 4°C, 2 days), frozen in isopentane (-40°C, 1 min) and finally cut in coronal or horizontal sections (40- μ m thickness). Free-floating sections were first washed in PBS (3x15 min) and then saturated and permeabilized in 0.25% triton X-100, 2% BSA in PBS (1h, room temperature). Primary antibodies were then incubated in 0.1% triton X-100, 2% BSA in PBS (4°C, overnight). The following primary antibodies were used: anti-Neuronal Nuclei (NeuN, mouse, 1:500, Merck Millipore), anti-CDP (Cux1, rabbit, 1:250, Santa Cruz), anti-RFP (mouse, 1:500, Abcam), anti-GFP (chicken, 1:250, Abcam), anti- γ -amino-butyric acid (GABA, rabbit, 1/250, Sigma-Aldrich), anti-CD68 (mouse, 1/500, AbCys), anti-GFAP (rabbit, 1/500, DAKO), anti-RECA (mouse, 1/500, Bio Rad), anti-neurofilament (mouse, 1/1000, ThermoFischer Scientific), anti-olig2 (mouse, 1/500, Abcam). After extensive washing in PBS (3x15 min), sections were incubated with appropriate species or subclass-specific secondary anti-bodies conjugated to FITC (Fluorescein, 1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories), Alexa Fluor 488, 555, 647 (1:500, Life Technologies) in the dark (2h, RT) followed by Hoechst staining (1:2000, 5 min, RT, Invitrogen). Finally, brain sections were extensively washed (3x15 min) and mounted onto

glass slides, air-dried and coverslipped with anti-fading mounting medium (Aqua Moly/Mount; Polysciences, Warrington, PA).

Image analysis. Confocal images were acquired using an inverted confocal microscope (LSM 710, Zeiss) and analyzed using ImageJ (NIH, USA). Cortical layer boundaries were based on Cux1 immunolabelling and DAPI staining. Cellular densities and fluorescence intensity (RECA, GFAP, Iba1) were estimated for the S1Bf cortex (Paxinos and Watson, 2007) based on the expression of specific markers (NeuN, DAPI, GFAP, Iba1) on horizontal brain sections using an in-house automated histological counting program. For each animal (n=3 /group), we estimated the cell density/fluorescence intensity in three different slices and the average of the three values was used for statistical comparison between groups.

Synchrotron X-ray cortical microtransections

Cortical microtransections were performed at ID17, the biomedical beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). X-rays were produced from a 1.6T wiggler located at 43 m from the sample. The white beam was filtered with Be (0.5 mm), C (1.5 mm), Al (1.5 mm) and Cu (1.0 mm) resulting in a spectrum extending from 50 to 350 keV (median energy: 107 keV). The dose rate in air at the animal surface was approximately 16,000 Gy.s⁻¹. We performed synchrotron irradiation as previously described (Serduc et al., 2010; Pouyatos et al., 2016). GAERS were anesthetized as for surgery (see above) and positioned on a rotation stage placed above a goniometer and low dose X-ray projections images (35–60 keV) of the rat head were acquired to delineate the irradiation fields defined from the bregma, as previously described (Pouyatos et al., 2013) (+45° from horizontal, antero-post: 0 to -4 mm, medio-lateral: + 5.5 mm centered, dorso-ventral: 2.5 mm centered on -2mm). Each transection was performed by one single 50 µm-thick microbeam entering the brain through 1 irradiation ports with an angle of 45° from the surface of the skull to specifically irradiate unilaterally the targeted brain area. Eleven such transections were performed between 0 mm and - 4 mm from the bregma to cover the S1Bf. We assessed the volumic dose in a rat head phantom by using PENELOPE-2006 Monte Carlo code. The entrance dose of each 50-µm beam was 540 Gy, defined as the optimal range for axon lesionning (Serduc et al., 2014).

Behavioral tests

Openfield and Rotarod tests were used to detect possible sensorimotor side-effects of synchrotron irradiation (Pouyatos et al. 2013). We used an accelerating paradigm (4–40 rpm, 5 min) on the Rotarod (Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) by averaging the latencies to fall off the rotating rod (3 trials). On the same day, rats were placed in the center of an open-field arena (50x50 cm) for 20 min and locomotion was video-tracked (ViewPoint, Civrioux, France) and quantified.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparison between two experimental groups was analyzed using a non-parametric Mann-Whitney test unless otherwise mentioned. SWD power follow-up in time and RABV input distribution in space were analyzed with 2-way ANOVA test with Sidak's correction for multiple comparison. Data in text and figure are expressed as mean + SEM unless otherwise mentioned. The significance level for all statistical analysis was set at $p \leq 0.05$.

Results

Localization of the cortical seizure generator

Several studies performed in two genetic rat models of absence epilepsy, *i.e.* GAERS and WAG/Rij, have shown that SWDs are initiated in the primary somatosensory cortex (S1) (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007; David et al., 2008; Polack et al., 2009; Pouyatos et al., 2013) and suggested that the SWD generator was constrained in the oro-facial part of this region (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007). To investigate this hypothesis and better localize the cortical area initiating SWDs, we used a 32-channel subdural flex-MEA placed on the surface of the cortex in adult GAERS in a way to cover unilaterally a large cortical area (6x4 mm) including the S1 and adjacent cortices (*i.e.*, motor cortex, parietal cortex and part of the auditory cortex) (Figure 1A). To determine where SWDs first arise, we calculated the h^2 coefficient (Lopes da Silva et al., 1989; Meeren et al., 2002; Wendling et al., 2009), a non-linear correlation index between all pairs of electrodes for a total of 80 SWDs ($n=4$ rats). We found the highest h^2 coefficient to be in the primary S1, with a hot spot in the barrel field area (S1Bf),

and a progressive decrease from S1 to M1 motor cortex (Figure 1B). The time-laps evolution of the h^2 index over the first 2 seconds of SWDs showed a progressive involvement of the S1, starting in the S1Bf (Figure 1C). Our data confirm the localization of the SWD generator in the S1 in GAERS and furthermore suggest that SWDs are specifically initiated in the S1Bf.

Identification of pathological connectivity of S1Bf neurons

Local input

Because SWD generation was suggested to be sustained by a pathological neuronal connectivity facilitating the hypersynchronization in AE (Depaulis and Charpier, 2017), we then addressed the question whether GAERS' S1Bf presented structural abnormalities of its neuronal connectivity. We thus compared the input connectivity of neurons in two main layers of S1Bf in GAERS and control Wistar rats by using a modified rabies virus (RABV) monosynaptic tracing-based strategy (see Methods, Figure 2A) (Wickersham et al., 2007). To this aim, we infected, in a layer-specific manner, either L2/3 or L5/6 neurons with GFP-G-TVA lentivirus two weeks before RABV-mCherry (Figure 2A). The location of starter cells (GFP+/mCherry+) and presynaptic neurons (mCherry+) was examined 7 days after the second injection. Cortical layer boundaries were assessed based on DAPI staining (Figure 2B and C) which was coherent with the cortical layer specific markers Cux1 (Supplementary Figure 1).

L2/3 targeting was efficient as we quantified a majority of starter cells in L2/3 (mean starter fraction in L2/3 = 0.86 ± 0.08 and 0.88 ± 0.125 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively) (Figure 2B). Presynaptic neurons coming from the S1Bf (*i.e.*, local input) were equally distributed throughout L2/3, L4 and L5/6 in GAERS and tend to be more important than for Wistar in L4 and L5/6 although no significant difference could be found (Mann-Whitney test, $p = 0.2$) (Figure 2B).

L5/6 targeting was also efficient as near 100% of starter cells were located in infragranular layers (mean starter fraction in L5/6 = 0.97 ± 0.03 and 0.98 ± 0.02 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively) (Figure 2C). In Wistar rats, we observed a major intralaminar local input with only limited ones from L2/3 neurons and very few from L4 (Figure 2C), in line with previous reports (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015). In GAERS, we found an overall increased number of presynaptic neurons across all cortical layers (Figure 2C) which was significant for the deep layer intralaminar inputs (mean input-to-starter ratio in L5/6 = $4.67 \pm$

0.94 and 1.39 ± 0.34 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$).

To further describe the spatial extent of input connectivity, we examined the distribution of presynaptic neurons along the antero-posterior axis (Figure 2D). The spatial distribution showed an increase of L5/6 inputs in GAERS (GAERS vs. Wistar, input-to-starter ratio different between $+160 \mu\text{m}$ and $-240 \mu\text{m}$ from starter cells zone; 2way ANOVA, $p \leq 0.05$) (Figure 2D). This increase is therefore restricted to a limited area around the starter cell zone and do not extend over all S1Bf.

GABAergic input

As cortical activity can be shaped and triggered by inhibition (Isaacson and Scanziani, 2011), we examined GABAergic inputs on S1Bf neurons using anti-GABA immunohistostaining (Figure 3A). For L2/3 starter cells, GAERS and Wistar rats showed a dense local GABAergic input (mCherry+/GABA+) (mean GABAergic input-to-starter ratio in L2/3 = 0.18 ± 0.04 and 0.051 ± 0.51 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively; Mann-Whitney test, $p=0.1$) in agreement with previous studies (Fino and Yuste, 2011; DeNardo et al., 2015). However, we found an important number of GABAergic inputs from L5/6 in GAERS that was not observed in Wistar rats (mean GABAergic input-to-starter ratio in L5/6 = 0.27 ± 0.1 and 0, in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) (Figure 3). In the case of L5/6 starter cells, we found that GABAergic input was also mainly local and intralaminar (Figure 3C) and was significantly increased in GAERS vs Wistar (mean GABAergic input-to-starter ratio in L5/6 = 0.34 ± 0.13 and 0.13 ± 0.01 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$).

Long range input

Because AE is characterized by fast intracortical and subcortical propagation of paroxysmic activity (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007; David et al., 2008), we examined whether the long range S1Bf connectivity was increased in GAERS (Figure 3D). As long-range input to L2/3 starter cells was almost inexistent in both strains, we focused on deep layer ones. In both GAERS and Wistar we found presynaptic neurons located in the thalamus, motor cortices, the secondary somatosensory cortex and in other areas of the primary somatosensory cortex (S1body) in line with previous studies (Veinante and Deschênes, 2003; DeNardo et al., 2015).

These inputs were generally more important in GAERS, a difference which was significant for inputs from the S1Body (mean input-to-starter ratio in S1body = 0.48 ± 0.39 and 0.08 ± 0.10 , in GAERS (n=3) and Wistar (n=3), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) (Figure 3D). These results suggest that the increased neuronal connectivity that we observed in GAERS is mainly located in the S1 cortex.

Altogether, our data showed that the canonical intracortical pathway exist in GAERS as supragranular neurons receive an important input from L4 neurons and project to the infragranular layer, in line with the literature in non-epileptic rodents (Douglas et al., 1989; Lübke and Feldmeyer, 2007; Lefort et al., 2009). In addition, our data suggest that L5/6 neurons receive more local inputs in GAERS than in Wistar and present increased GABAergic projections.

Alteration of pathological S1Bf connectivity by synchrotron X-ray microtransections

Recently, several studies have shown that horizontal neuronal connections of L5 in the S1 are critical in sensory processing and physiology (Adesnik and Scanziani, 2010; Narayanan et al., 2015; Schnepel et al., 2015). In particular, it has been shown that these connections allow the overall neuronal synchronization within this structure. In this context, we made the hypothesis that the increased connectivity that we observed in the deep layer neurons in GAERS with RABV tracing, could play a critical role in SWDs generation and/or propagation. To test this hypothesis, we used synchrotron-generated X-ray microtransections over the S1Bf of GAERS rats to interrupt neuronal connections and especially horizontal ones. This method was developed initially to treat brain tumors and several studies have reported that high doses of photons (up to 800 Gy) deposited in thin microbeams (50-100 μm) are efficient on tumors but leave intact the microvasculature and have limited histological and behavioral consequences (Serduc et al., 2010; Pouyatos et al., 2016; Fardone et al., 2017; Studer et al., 2015).

In line with these previous studies, two months after the irradiation, we observed that synchrotron-generated microtransections of 50- μm induced a neuronal (NeuN+) loss limited to the tracks of irradiation (Figure 4A and Supplementary Figure 2A). The microvasculature (RECA+) was still present in the tracks and we observed no differences of microglia density (Iba1+) (Supplementary Figure 2 A and B) nor oligodendrocytes density inside and outside the irradiation tracks (CD 68+, data not shown). We found a slight astrogliosis at the border of the

tracks as evidenced by an increased labeling of GFAP (Supplementary Figure 2B) in agreement with previous reports (Fardone et al., 2017). Moreover, we observed an absence of deleterious effect on the animals' behavior two months post-irradiation. Indeed, we found no significant differences between synchrotron-irradiated GAERS (GAERS/Ir) and sham GAERS for either locomotion in the open-arena (mean distance travelled = 728.6 ± 123.4 cm and 580.6 ± 123.4 cm, in GAERS (n=7) and GAERS/Ir (n=9), respectively; Mann-Whitney test, $p=0.41$) or sensorimotor coordination in the Rotarod test (mean maximum speed = 21.08 ± 2.86 rpm and 20.27 ± 1.61 rpm, in GAERS (n=8) and GAERS/Ir (n=10), respectively; Mann-Whitney test, $p=0.68$) (Supplementary Figure 3A and B). Further, GAERS/Ir were still able to integrate sensory stimulation (Supplementary Figure 3C and D) as air puff-generated sensory-evoked potentials had the same latency and amplitude (mean latency = 97.3 ± 4.19 ms and 92.6 ± 4.63 ms ($p=0.06$); mean amplitude = 378.4 ± 65.1 μ V and 263 ± 102 μ V ($p=0.89$); in GAERS (n=4) and GAERS/Ir (n=5), respectively; Mann-Whitney test, n.s.) (Supplementary Figure 3E and F). These results confirm that the synchrotron-generated microtransections that we performed with 50- μ m microbeams did not induced ischemic, inflammatory or behavioral side-effects, in line with previous studies (Serduc et al., 2010; Pouyatos et al., 2013, 2016).

To validate the consequences of our synchrotron-generated microtransections through S1Bf, we applied the same RABV strategy as above and compared the cortical neuronal inputs of GAERS/Ir to the two previous groups, i.e. GAERS and Wistar. As above, L2/3 and L5/6 layer-specific targeting was efficient after synchrotron irradiation (GAERS/Ir) (mean starter fraction = 0.78 ± 0.09 and 0.98 ± 0.01 for L2/3 (n=4) and L5/6 (n=3), respectively) (Supplementary Figure 4A and B). In GAERS/Ir injected in L2/3, we found no statistical differences in terms of total inputs when compared to GAERS and Wistar (Figure 4B). However, after anti-GABA staining, we found a decrease of L5/6 GABAergic inputs to L2/3 in GAERS/Ir when compared to GAERS (mean GABAergic input-to-starter ratio from L5/6 = 0.27 ± 0.12 and 0.05 ± 0.02 , in GAERS (n=3) and GAERS/Ir (n=4), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) (Figure 4D) whereas there was no significant differences when compared to Wistar (Figure 4D, mean GABAergic input-to-starter ratio from L5/6 = 0 in Wistar (N=3); Mann-Whitney test, $p=0.09$). In GAERS/Ir injected in L5/6, we observed a decrease of inputs to starter cells that was not significant when compared to GAERS (mean input-to-starter ratio from L5/6 = 4.67 ± 0.94 , 2.96 ± 1 and 1.39 ± 0.34 , in GAERS (n=3) and GAERS/Ir (n=4), respectively; Mann-Whitney test,

p=0.2) (Figure 4C). Of note, the number of these inputs remain non-significantly higher in GAERS/Ir than in Wistar controls (mean input-to-starter ratio from L5/6 = 1.39 ± 0.34 for Wistar (n=3); Mann-Whitney test, p=0.2) (Figure 4C). A non-significant decrease of intralaminar GABAergic input was also observed in GAERS/Ir vs. GAERS (p=0.3) (Figure 4E). Furthermore, our analysis of the antero-posterior distribution of presynaptic neurons revealed a significant difference between +80 μm and -80 μm from the starter cells zone in GAERS/Ir vs GAERS (Supplementary Figure 4C, 2way ANOVA, $p \leq 0.05$). These results show that after synchrotron X-ray microtransections the spatial distribution of L5/6 inputs was close to what was observed in Wistar rats and different from GAERS near the infection zone (Supplementary Figure 4C). Interestingly, cortical microtransections did not change S1Bf long range connectivity (Supplementary Figure 4D).

Our data show that synchrotron-generated microtransections of the S1Bf decreases intracortical connectivity especially with a significant decrease of GABAergic input.

Decreased connectivity reduces SWD power

We then hypothesized that the sectioning of connections in S1Bf L5/6 by synchrotron-generated microtransections would alter the generation of SWD in GAERS. To this aim, we performed freely moving LFP recordings of the S1Bf in GAERS/Ir and compared them to sham GAERS. Our recordings performed at different time-points post-irradiation revealed a decreased amplitude of SWDs in GAERS/Ir vs GAERS (Figure 5A). Time-frequency analysis indicated a decreased power during SWDs in GAERS/Ir (Figure 5A) as soon as two weeks post-irradiation (mean normalized SWD power = 1 ± 0.13 a.u. and 0.39 ± 0.05 a.u., in GAERS (N=5) and GAERS/Ir (N=6), respectively, with $n \geq 24$ SWD/group; 2way ANOVA, $p \leq 0.05$) and for up to two months (mean normalized SWD power = 1 ± 0.22 a.u. and 0.58 ± 0.06 a.u., in GAERS (n=5) and GAERS/Ir (n=6), respectively, with $n \geq 24$ SWD/group; 2way ANOVA, $p \leq 0.05$) (Figure 5B). It is important to note that neither the internal frequency of SWDs (Figure 5A, arrows) nor their occurrence were modified (Supplementary Figure 5A-C). No significant differences were observed between GAERS and GAERS/Ir when we compared the power spectrum content of interictal LFP activity (Figure 5C).

To better understand the decreased power of SWDs whereas their internal frequency, number and occurrence were not modified by synchrotron-generated microtransections, we

hypothesized that the changes of neuronal connections should impair the neuronal synchronization within the S1Bf. To examine this hypothesis, we analyzed the waveform of SWDs and more specifically the spike component known to reflect neuronal synchronization (Williams et al., 2016; Jarre et al., 2017b). As shown by the superimposition of SWDs mean waveform (Figure 5E-G), the shape was stable overtime in GAERS. We observed that the spike duration was not affected by microtransections (Figure 5E-G and G; mean duration = 48.41 ± 2.12 ms and 54.04 ± 3.82 ms, in GAERS and GAERS/Ir; 4 weeks post irradiation; $n \geq 25$ spikes/group; Mann-Whitney test, $p=0.3$) in line with the preservation of the internal frequency of SWD (see above). Furthermore, we observed no differences in negative slope and half duration (Supplementary Figure 5D and E). However, we found that the positive slope was significantly decreased in GAERS/Ir (Figure 5E-G; mean slope = 30.37 ± 3.06 mV/s and 15.04 ± 3.32 mV/s, in GAERS (N=5) and GAERS/Ir (N=6), respectively; 4 weeks post irradiation; $n \geq 25$ spikes/group; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) reflecting a decreased neuronal synchronization during the second half of the spike. In addition, a reduced amplitude of the spike was observed (Figure 5E) as expected by the decrease of SWDs power observed in the time-frequency analysis.

Altogether, our results showed that synchrotron-generated microtransections within the S1Bf reduced SWDs power and waveform suggesting a decreased neuronal synchronization during seizures that could be due to the interruption of deep layer neurons connections as shown by RABV tracing.

Decreased connectivity effect on SWD intracortical generating circuit

The data presented above suggest a role of deep layer connectivity in pathological neuronal synchronization as seen during SWD. This raised two hypotheses: (i) neuronal synchronization first takes place in each cortical column via vertical connections (Lübke and Feldmeyer, 2007; Lefort et al., 2009) and then deep layer horizontal connections allow column-to-column summation and propagation of paroxysmic activity (Adesnik and Scanziani, 2010) or (ii) horizontal connections already play an active role in neuronal synchronization across layers and columns during the generation of SWD (Narayanan et al., 2015; Schnepel et al., 2015). To address these two hypotheses, we performed *in vivo* multi-channel silicon probe recordings

across S1Bf neuronal layers in sedated and immobilized rats. From such LFP recordings, we performed Current Source Density (CSD) analysis of the first spike of SWDs in GAERS (N(rats)=5, n(spikes) = 50) and observed an important dipole in L5/6 that shifted first toward L2/3 during the negative phase of the spike and finally to L4 during the positive phase (Figure 6B, left). Our data therefore show the L5/6→L2/3→L4 sequence of propagation of the paroxysmic activity during SWD previously suggested by intracellular recordings (Polack et al., 2007). When we performed the same analysis on GAERS/Ir (N(rats)=5, n(spikes) = 50), we observed a decreased source in L5/6 followed by a more prominent dipole in L2/3 as in L4 (Figure 6A, right). The reduced dipole in L5/6 suggests a decrease of neuronal synchronization in these layers. Our results therefore support our second hypothesis suggesting that the hypersynchronization phenomenon during SWD involves several cortical columns simultaneously. They also confirm for the first time that SWD generation/initiation in sham GAERS involve a L5/6→L2/3→L4 circuit in the S1Bf.

Decreased connectivity reduces neuronal synchronization during SWD

Freely-moving and silicon probes recordings suggest both a decreased neuronal synchronization during SWDs. To further understand the effects of synchrotron X-ray microtransections on neuronal activity and synchronization in the different layers of S1Bf, we examined the multi-unit activity (MUA, Figure 6C) by high pass filtering of raw data. We first found that MUA was significantly increased in L4 both during and in-between SWDs in GAERS/Ir when compared to GAERS (mean L4 ictal firing rate = 88.25 ± 23.26 Hz and 27.45 ± 9.79 Hz; mean L4 interictal firing rate = 6.68 ± 3.69 Hz and 40.01 ± 11.87 Hz, in GAERS (n=5) and GAERS/Ir (n=5), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$), whereas there was no significant difference in L5/6 and L2/3 (Figure 6D-E). To determine whether this increased activity of L4 neurons was associated with a modified timescale firing, we calculated the probability of firing of neurons depending on the spike-component of SWDs. In GAERS, discharge probability followed a Gaussian distribution in L2/3, L4 and L5/6 (Figure 6F; L2/3: $R^2=0.96$; L4: $R^2=0.90$; L5/6: $R^2=0.92$). In GAERS/Ir, we found a less pronounced Gaussian fitting in all layers (Figure 6F; L2/3: $R^2=0.77$; L4: $R^2=0.85$; L5/6: $R^2=0.78$). In addition, we found that the majority of MUA were detected in GAERS shortly before the peak of the spike (Figure 6F and Supplementary 6C and D) with a latency of 6 ms in L5/6 and L2/3 and 0.5 ms in L4 (Supplementary Figure 6E-G). In GAERS/Ir, the maximum activity was also detected at the peak

of the spike with a latency of 11.5 ms in L5/6, 6 ms in L2/3 and 4 ms in L4 (Supplementary Figure 6E-G). In GAERS/Ir, we found that neuronal discharges were not altered in L2/3 and L4 whereas the time lag was significantly increased in L5/6 neurons when compared to sham GAERS (Supplementary Figure 6G, Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$), in line with our CSD analysis. In addition, neurons from all layers displayed a broader distribution of activity in time in GAERS/Ir (Figure 6F and Supplementary Figure 6D) suggesting a decreased synchronization of neuronal activity. In general, most of the activity was detected during the spike, in line with previous work showing that pyramidal cortical neurons are activated during the spike and mostly silent during the wave-component of SWDs (Williams et al. 2016).

Altogether our results show an increased activity in L4 and a decreased specificity of activation during the epileptic spike in L2/3 and L5/6 suggesting an important role of deep layer neurons connections in neuronal control and pathological synchronization.

Discussion

Altogether, our results support the hypothesis that SWD in the GAERS are generated in the S1Bf by a pathological L5/6→L2/3→L4 functional circuit. The exploration of GAERS' S1Bf structural connectivity revealed an increased L5/6→L5/6 horizontal connection and an increased GABAergic L5/6→L2/3 connection compared to Wistar controls (Figure 7). Using synchrotron x-ray microtransection of GAERS' S1Bf we were able to interrupt these connections, as evidenced by RABV tracing, and obtained a significant reduction of SWD power indicative of a decreased synchronization of neurons during SWD. Our study therefore provides several lines of evidences that suggest the existence of a deep layer increased connectivity in GAERS that is critical for the pathological neuronal synchronization during absence seizures. Importantly, despite the interference of X-ray microtransections on L5/6→L5/6 and L5/6→L2/3 connections, we found no difference in SEP which suggests a preservation of the physiological network activity, in line with our data collected in behavioural tests and previous study (Pouyatos et al., 2013; Fardone et al., 2017). These results are in favor of a specific role of deep layer S1Bf hyperconnectivity in SWD generation and propagation.

They also suggest that inhibitory circuits may be altered in GAERS with increased local and distal intracortical GABAergic connections that could favor synchronization and/or time constriction of excitatory neurons activity (Figure 7). Altogether, our results support the hypothesis of structural abnormalities of both excitation and inhibition leading to hyperconnectivity and hypersynchronization of neurons at the site of generation of absence seizures in the GAERS.

Synchrotron microtransections induce tissular changes with functional effects

Cortical microtransections induce a loss of neurons limited to the track of irradiation. We cannot exclude an effect of this loss in the functional effects we observed. Nevertheless, this cannot explain by itself these effects, especially on SWD power, as it is spatially limited ($\approx 10\%$ of S1Bf surface). Moreover, previous reports showed that synchrotron microtransections is effective to induce axonal lesions (Serduc et al., 2014) in line with our RABV tracing data. It has also been shown that pyramidal neurons near irradiation sites present a decreased resting membrane potential but remain functional and keep their responsiveness to stimulation (Pouyatos et al., 2013). One interesting hypothesis is that X-ray could have a more important deleterious effect on GABAergic interneurons because they seem to be intrinsically more sensitive to environment changes (Czéh et al., 2015).

SWD are initiated through a structural and functional intracortical circuit

Neocortical connectivity and network activity have been extensively studied both structurally (Veinante and Deschênes, 2003; Miyamichi et al., 2011; DeNardo et al., 2015; Narayanan et al., 2015) and functionally (Bureau et al., 2004; Shepherd and Svoboda, 2005; Shepherd et al., 2005; Reyes-Puerta et al., 2015; van der Bourg et al., 2016) mainly to understand the coding of physiological functions. In this respect, S1Bf has been a heuristic model because of its stereotyped organization in layers and columns and its implication in the integration of sensory information in rodents. In particular, L5 neurons integrate information through excitatory connections coming from L2/3 from the same column (Lefort et al., 2009) and from L2/3, L5 and L6A of adjacent columns up to 2 mm in the antero-posterior axis (Schnepel et al., 2015). These L5 neurons send information to the thalamus, the contro-lateral hemisphere and motor cortex (Veinante et al., 2000; Veinante and Deschênes, 2003; Miyamichi et al., 2011).

In the S1, some studies have reported connections from L5A→L2 although in a less important way (Shepherd et al., 2005).

Our knowledge of the cortical circuits that generates generalized seizures as observed in genetic epilepsies still remain limited. In AE, using genetic models in rodents, we and others have shown that the S1 is critical in the initiation of SWDs, a prototypic form of non-convulsive generalized seizure (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007; David et al., 2008; Polack et al., 2009). In GAERS, using intracellular recordings combined with EEG recordings, we suggested that L5 neurons lead seizure generation (Polack et al., 2007; Depaulis and Charpier, 2017). Here, by performing simultaneous multi-site LFP recording over several cortical areas with flexMEA, we refined the location of SWD initiation to the S1Bf cortex. Furthermore, using multi-channel silicon probes across the different cortical layer and CSD analysis we evidenced the "vertical" L5→L2/3→L4 sequence of events between layers. As the increased connectivity of deep layer neurons observed in GAERS extends over several hundreds of μm we propose that the SWD generating circuit requires transcolumnar synchronization, a process that is allowed by the increased horizontal connections between deep layer neurons in these animals.

Inhibitory connections are key players in neuronal pathological synchronization

Inhibition in the cortex is known to be mostly local (Fino and Yuste, 2011) and to control and modulate excitatory cells (Wilent and Contreras, 2005; Cruikshank et al., 2007; Silberberg and Markram, 2007; Fino and Yuste, 2011). Therefore, the balance between inhibition and excitation is critical for cortical processing (Wilent and Contreras, 2005). In particular, this inhibition actively modulates cortical function by filtering information (Yu et al., 2016) and modulating its propagation (Petersen et al., 2003a). Our present results support the hypothesis that inhibition could constrain excitatory cells activation during SWD (Isaacson and Scanziani, 2011). Indeed, we showed that after a loss of these connections a general increase of the neuronal activity (i.e. during the spike and the wave) is observed which is associated with a reduced amplitude of the SWDs. In addition, the synchronicity of cell firing is decreased during the spike in GAERS/Ir, especially in L2/3 where we found by RABV tracing a decreased GABAergic input from the infragranular layer neurons (Figure 7). As inhibition can modulate cortical activity, our data suggest that this input could shape the spike and wave components

of SWDs. In support of this hypothesis, a role in active silencing of pyramidal cells by inhibitory interneurons has been suggested during the wave-component of the SWD in GAERS (Williams et al., 2016). Furthermore, our CSD analysis of the first spike of SWD performed after microtransections suggests that the inhibitory recruitment is changed with a more local dipole in L2/3. Moreover, our electrophysiological and histological data suggest that this connection is GABAergic and more important in GAERS than in Wistar (Figure 7). This inhibitory connection could allow the progressive entrainment of supragranular layer neurons to the paroxysmic activity initiated in infragranular pyramidal neurons.

Conclusion

In the present study, we suggest that parts of transcolumnar and translaminar neuronal connections are more developed in GAERS, in particular those expressing GABA. We propose that transcolumnar hyperconnection represent a critical player in the generation of absence seizures. Further studies using animal models are necessary to better understand the pathological role of the hyperconnectivity in the S1Bf, how it develops during brain maturation and what impacts does it have on physiological information processings in this cortical area.

Fundings

This work was supported by fundings from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), the *Agence National de la Recherche* (ANR, « EPIRAD » # 13-BSV1-0012-01 2013 and « SoAbsence » #16-CE37-0021 2016). FS received support from the *Ligue Française contre l'Epilepsie* and Grenoble Alpes University.

Acknowledgements:

We thank S Andrieu, C Colomb and all the staff of the GIN animal facility for animal care. We thank also E Brun, C Muzelle, PP Lenck-Santini and O David for their help on signal and images analysis. We thank I Guillemain for her comments on the manuscript.

References:

- Adesnik, H., and Scanziani, M. (2010). Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464, 1155–1160.
- Althaus, A.L., Zhang, H., and Parent, J.M. (2016). Axonal plasticity of age-defined dentate granule cells in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 86, 187–196.
- Bai, X., Vestal, M., Berman, R., Negishi, M., Spann, M., Vega, C., Desalvo, M., Novotny, E.J., Constable, R.T., and Blumenfeld, H. (2010). Dynamic Time Course of Typical Childhood Absence Seizures: EEG, Behavior, and Functional Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* 30, 5884–5893.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51, 676–685.
- van der Bourg, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Laurenczy, B., Wieckhorst, M., Stüttgen, M.C., Luhmann, H.J., and Helmchen, F. (2016). Layer-Specific Refinement of Sensory Coding in Developing Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex.*
- Bureau, I., Shepherd, G.M., and Svoboda, K. (2004). Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron* 42, 789–801.
- Callaway, E.M., and Luo, L. (2015). Monosynaptic Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 8979–8985.
- Chipaux, M., Vercueil, L., Kaminska, A., Mahon, S., and Charpier, S. (2013). Persistence of Cortical Sensory Processing during Absence Seizures in Human and an Animal Model: Evidence from EEG and Intracellular Recordings. *PLOS ONE* 8, e58180.
- Cruikshank, S.J., Lewis, T.J., and Connors, B.W. (2007). Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat. Neurosci.* 10, 462–468.

- Czéh, B., Varga, Z.K.K., Henningsen, K., Kovács, G.L., Miseta, A., and Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus* 25, 393–405.
- David, O., Guillemain, I., Saille, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., and Depaulis, A. (2008). Identifying Neural Drivers with Functional MRI: An Electrophysiological Validation. *PLoS Biol.* 6, e315.
- DeNardo, L.A., Berns, D.S., DeLoach, K., and Luo, L. (2015). Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing. *Nat. Neurosci.* 18, 1687–1697.
- Depaulis, A., and Charpier, S. (2017). Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neurosci. Lett.*
- Depaulis, A., David, O., and Charpier, S. (2016a). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J. Neurosci. Methods* 260, 159–174.
- Depaulis, A., David, O., and Charpier, S. (2016b). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J. Neurosci. Methods* 260, 159–174.
- Deshpande, A., Bergami, M., Ghanem, A., Conzelmann, K.-K., Lepier, A., Götz, M., and Berninger, B. (2013). Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1152–E1161.
- Douglas, R.J., Martin, K.A.C., and Whitteridge, D. (1989). A Canonical Microcircuit for Neocortex. *Neural Comput.* 1, 480–488.
- Epsztein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., and Crépel, V. (2005). Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *J. Neurosci.* 25, 8229–8239.

Fardone, E., Bravin, A., Conti, A., Bräuer-Krisch, E., Requardt, H., Bucci, D., Duc, G.L., Battaglia, G., and Romanelli, P. (2017). Rat sensorimotor cortex tolerance to parallel transections induced by synchrotron-generated X-ray microbeams. *Sci. Rep.* 7, 14290.

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

Feldt Muldoon, S., Soltesz, I., and Cossart, R. (2013). Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3567–3572.

Fino, E., and Yuste, R. (2011). Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron* 69, 1188–1203.

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

Holmes, M.D., Brown, M., and Tucker, D.M. (2004). Are “Generalized” Seizures Truly Generalized? Evidence of Localized Mesial Frontal and Frontopolar Discharges in Absence. *Epilepsia* 45, 1568–1579.

Isaacson, J.S., and Scanziani, M. (2011). How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72, 231–243.

Jarre, G., Guillemain, I., Deransart, C., and Depaulis, A. (2017a). Chapter 32 - Genetic Models of Absence Epilepsy in Rats and Mice. In *Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)*, A. Pitkänen, P.S. Buckmaster, A.S. Galanopoulou, and S.L. Moshé, eds. (Academic Press), pp. 455–471.

Jarre, G., Altwegg-Boussac, T., Williams, M.S., Studer, F., Chipaux, M., David, O., Charpier, S., Depaulis, A., Mahon, S., and Guillemain, I. (2017b). Building Up Absence Seizures in the Somatosensory Cortex: From Network to Cellular Epileptogenic Processes. *Cereb. Cortex* 27, 4607–4623.

Kandel, A., and Buzsáki, G. (1997). Cellular–synaptic generation of sleep spindles, spike-and-wave discharges, and evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J. Neurosci.* 17, 6783–6797.

Lübke, J., and Feldmeyer, D. (2007). Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct. Funct.* 212, 3–17.

Le Van Quyen, M., Amor, F., and Rudrauf, D. (2006). Exploring the dynamics of collective synchronizations in large ensembles of brain signals. *J. Physiol.-Paris* 100, 194–200.

Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J.-C., and Petersen, C.C.H. (2009). The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron* 61, 301–316.

Loiseau, P., Duche, B., and Pédespan, J.-M. (1995). Absence epilepsies. *Epilepsia* 36, 1182–1186.

Lopes da Silva, F., Pijn, J.P., and Boeijinga, P. (1989). Interdependence of EEG signals: linear vs. nonlinear associations and the significance of time delays and phase shifts. *Brain Topogr.* 2, 9–18.

Mahon, S., and Charpier, S. (2012). Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11377–11389.

Meeren, H.K.M., Pijn, J.P.M., Van Luijckelaar, E.L.J.M., Coenen, A.M.L., and Lopes da Silva, F.H. (2002). Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1480–1495.

Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., et al. (2011). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191–196.

Mountcastle, V.B. (1957). Modality and Topographic Properties of Single Neurons of Cat's Somatic Sensory Cortex. *J. Neurophysiol.* 20, 408–434.

Narayanan, R.T., Egger, R., Johnson, A.S., Mansvelder, H.D., Sakmann, B., de Kock, C.P.J., and Oberlaender, M. (2015). Beyond Columnar Organization: Cell Type- and Target Layer-Specific Principles of Horizontal Axon Projection Patterns in Rat Vibrissal Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 25, 4450–4468.

Nersesyan, H., Herman, P., Erdogan, E., Hyder, F., and Blumenfeld, H. (2004). Relative Changes in Cerebral Blood Flow and Neuronal Activity in Local Microdomains during Generalized Seizures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1057–1068.

Nicholson, C., and Freeman, J.A. (1975). Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J. Neurophysiol.* 38, 356–368.

Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition.*

Petersen, C.C.H., Hahn, T.T.G., Mehta, M., Grinvald, A., and Sakmann, B. (2003). Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13638–13643.

Polack, P.-O., Guillemain, I., Hu, E., Deransart, C., Depaulis, A., and Charpier, S. (2007). Deep Layer Somatosensory Cortical Neurons Initiate Spike-and-Wave Discharges in a Genetic Model of Absence Seizures. *J. Neurosci.* 27, 6590–6599.

Polack, P.-O., Mahon, S., Chavez, M., and Charpier, S. (2009). Inactivation of the Somatosensory Cortex Prevents Paroxysmal Oscillations in Cortical and Related Thalamic Neurons in a Genetic Model of Absence Epilepsy. *Cereb. Cortex* 19, 2078–2091.

Pouyatos, B., Serduc, R., Chipaux, M., Chabrol, T., Bräuer-Krisch, E., Nemoz, C., Mathieu, H., David, O., Renaud, L., Prezado, Y., et al. (2013). Synchrotron X-ray interlaced microbeams suppress paroxysmal oscillations in neuronal networks initiating generalized epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 51, 152–160.

Pouyatos, B., Nemoz, C., Chabrol, T., Potez, M., Bräuer, E., Renaud, L., Pernet-Gallay, K., Estève, F., David, O., Kahane, P., et al. (2016). Synchrotron X-ray microtransections: a non invasive approach for epileptic seizures arising from eloquent cortical areas. *Sci. Rep.* 6, 27250.

Reyes-Puerta, V., Sun, J.-J., Kim, S., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2015). Laminar and Columnar Structure of Sensory-Evoked Multineuronal Spike Sequences in Adult Rat Barrel Cortex In Vivo. *Cereb. Cortex* 25, 2001–2021.

Schnepel, P., Kumar, A., Zohar, M., Aertsen, A., and Boucsein, C. (2015). Physiology and Impact of Horizontal Connections in Rat Neocortex. *Cereb. Cortex* 25, 3818–3835.

Serduc, R., Bräuer-Krisch, E., Siegbahn, E.A., Bouchet, A., Pouyatos, B., Carron, R., Pannetier, N., Renaud, L., Berruyer, G., Nemoz, C., et al. (2010). High-Precision Radiosurgical Dose Delivery by Interlaced Microbeam Arrays of High-Flux Low-Energy Synchrotron X-Rays. *PLOS ONE* 5, e9028.

Serduc, R., Bouchet, A., Pouyatos, B., Renaud, L., Bräuer-Krisch, E., Duc, G.L., Laissue, J.A., Bartzsch, S., Coquery, N., and Looij, Y. van de (2014). Synchrotron X Ray Induced Axonal Transections in the Brain of Rats Assessed by High-Field Diffusion Tensor Imaging Tractography. *PLOS ONE* 9, e88244.

Shepherd, G.M.G., and Svoboda, K. (2005). Laminar and Columnar Organization of Ascending Excitatory Projections to Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 25, 5670–5679.

Shepherd, G.M.G., Stepanyants, A., Bureau, I., Chklovskii, D., and Svoboda, K. (2005). Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nat. Neurosci.* 8, 782–790.

Silberberg, G., and Markram, H. (2007). Disynaptic Inhibition between Neocortical Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells. *Neuron* 53, 735–746.

Studer, F., Serduc, R., Pouyatos, B., Chabrol, T., Bräuer-Krisch, E., Donzelli, M., Nemoz, C., Laissue, J.A., Estève, F., and Depaulis, A. (2015). Synchrotron X-ray microbeams: A promising tool for drug-resistant epilepsy treatment. *Phys. Med.* 31, 607–614.

Tovote, P., Esposito, M.S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J.P., Markovic, M., Wolff, S.B.E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., et al. (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*.

Tucker, D.M., Brown, M., Luu, P., and Holmes, M.D. (2007). Discharges in ventromedial frontal cortex during absence spells. *Epilepsy Behav.* 11, 546–557.

Uhlhaas, P.J., and Singer, W. (2006). Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology. *Neuron* 52, 155–168.

Veinante, P., and Deschênes, M. (2003). Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J. Comp. Neurol.* 464, 98–103.

- Veinante, P., Lavallée, P., and Deschênes, M. (2000). Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 424, 197–204.
- Wendling, F., Bartolomei, F., Bellanger, J.J., and Chauvel, P. (2001). Interpretation of interdependencies in epileptic signals using a macroscopic physiological model of the EEG. *Clin. Neurophysiol.* 112, 1201–1218.
- Wendling, F., Ansari-Asl, K., Bartolomei, F., and Senhadji, L. (2009). From EEG signals to brain connectivity: A model-based evaluation of interdependence measures. *J. Neurosci. Methods* 183, 9–18.
- Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J.O., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.-K., Young, J.A.T., and Callaway, E.M. (2007). Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons. *Neuron* 53, 639–647.
- Wilent, W.B., and Contreras, D. (2005). Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* 8, 1364–1370.
- Williams, M.S., Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Lecas, S., Mahon, S., and Charpier, S. (2016). Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model: Epileptic seizures and information processing. *J. Physiol.*
- Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17, 205–242.
- Yan, B., and Li, P. (2013). The emergence of abnormal hypersynchronization in the anatomical structural network of human brain. *NeuroImage* 65, 34–51.
- Yu, J., Gutnisky, D.A., Hires, S.A., and Svoboda, K. (2016). Layer 4 fast-spiking interneurons filter thalamocortical signals during active somatosensation. *Nat. Neurosci.* 19, 1647–1657.

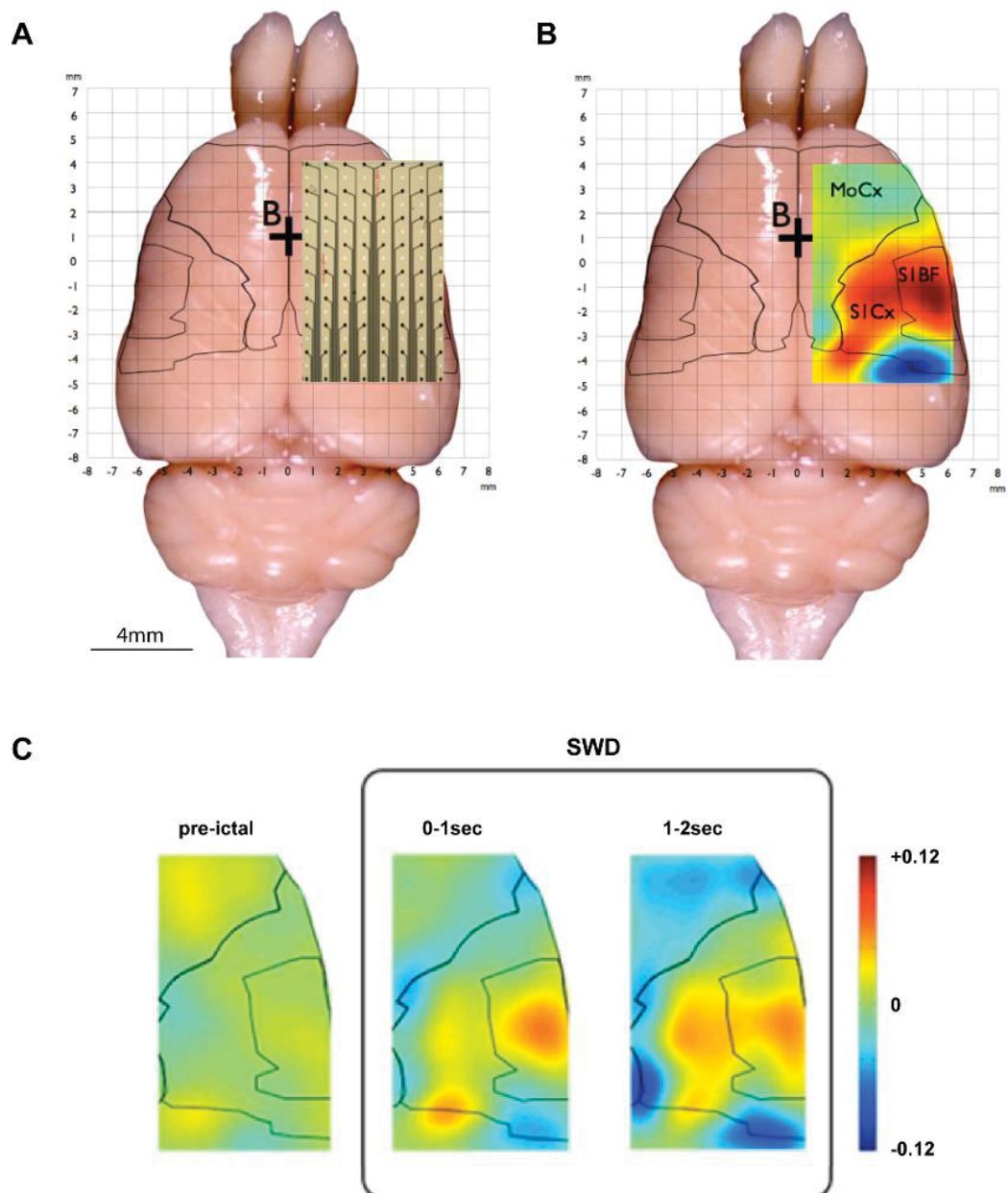


Figure 1 : Localization of SWD cortical initiating zone in GAERS.

(A) Schematic representation of Flex MEA placement over the right hemisphere.

(B) Average of h^2 non-linear correlation color-coded map with maximum in S1BF (N=4 GAERS, n=80 SWDs).

(C) Progressive increase of h^2 index during the first 2 seconds of SWDs in S1Cx.

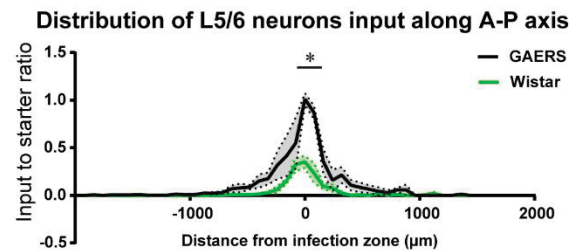
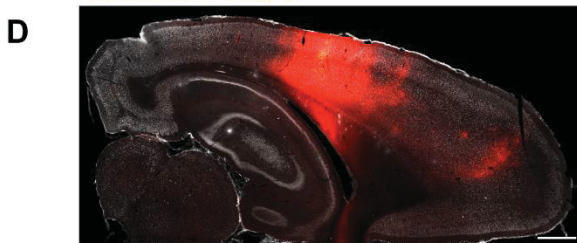
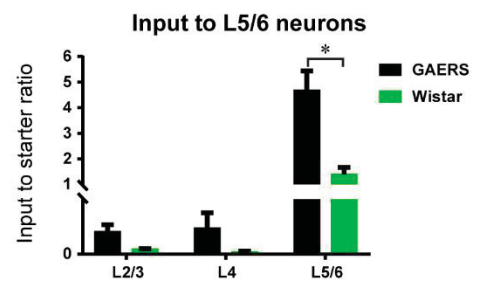
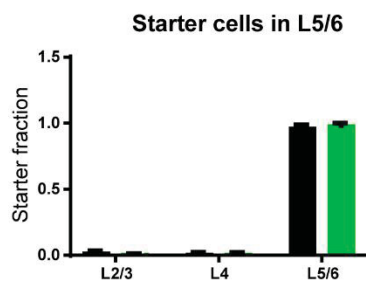
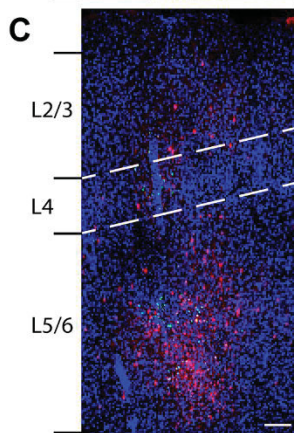
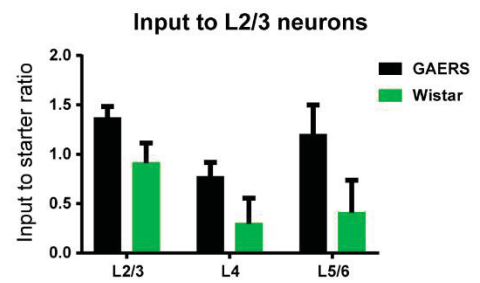
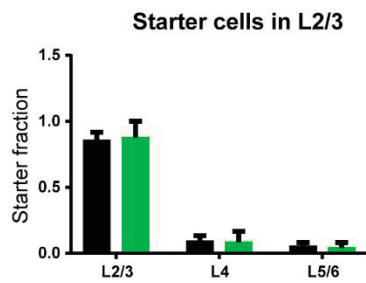
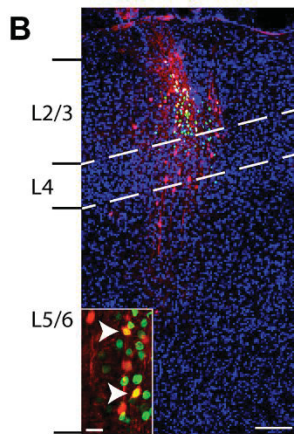
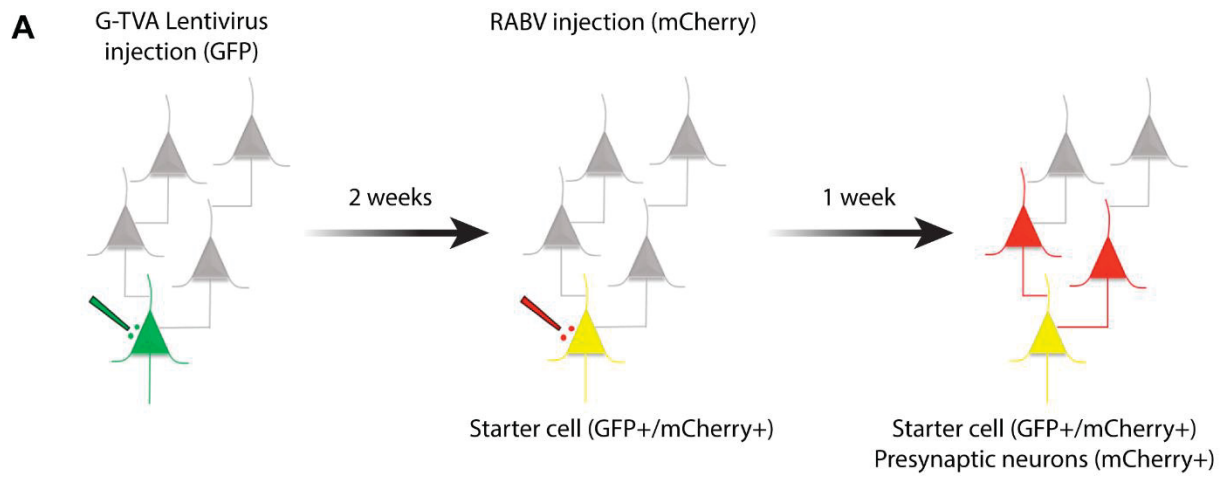


Figure 2: Layer specific RABV monosynaptic retrograde tracing of S1Bf neuronal connectivity.

(A) Schematic representation of experimental design for tracing monosynaptic inputs by first injection of G-TVA expressing lentivirus then RABV.

(B) Input tracing for L2/3 neurons. (Left) Example of a coronal section showing infection zone in L2/3 with starter cells (yellow) and their first-order presynaptic partners (red). Arrowheads in inset point to starter cells. Scale bars represent 200 μm (main panel) and 20 μm (inset). (Middle) Starter cells localization across cortical layers (mean+SEM). (Right) Input distribution across cortical layers (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar).

(C) Same as (B) but for L5/6 located starter cells. (N=3 in GAERS and Wistar; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(D) (Left) Example of a horizontal section showing presynaptic neurons distributed along S1Bf. Scale bar represents 400 μm . (Right) Distribution of L5/6 starter cells presynaptic neurons along antero-posterior axis. (N=3 in GAERS and Wistar; * $p \leq 0.005$, 2way ANOVA test).

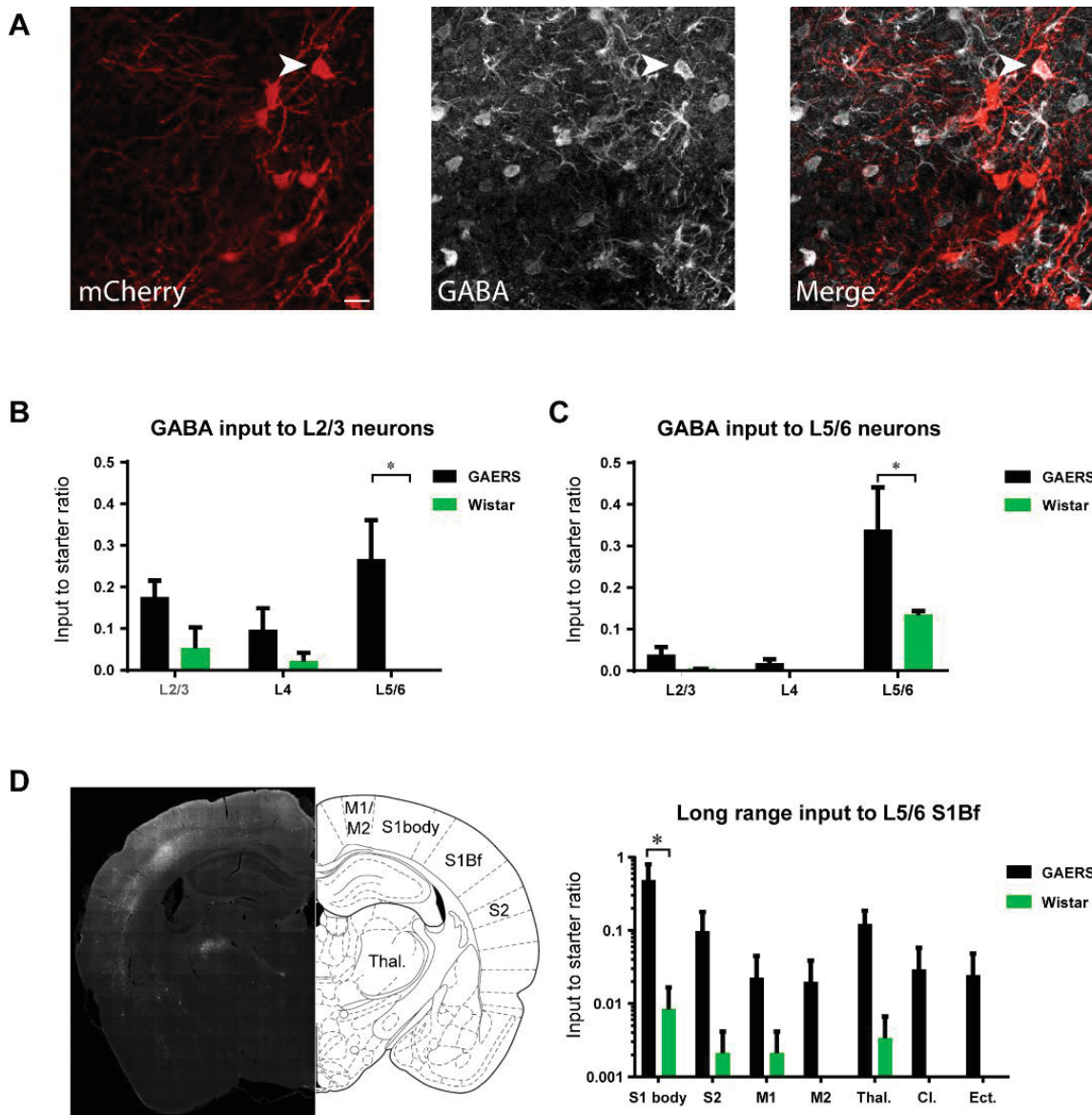


Figure 3 : GABAergic and long distance RABV monosynaptic retrograde tracing of S1Bf neurons.

(A) Example of coronal section with one RABV-infected presynaptic neuron (mCherry+) expressing GABA (arrowhead). Scale bar represents 20 μ m.

(B) GABAergic input distribution across cortical layers for L2/3 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(C) GABAergic input distribution across cortical layers for L5/6 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(D) Long range input tracing to L5/6 S1Bf starter cells. (Left) Example of coronal section and corresponding atlas plate showing presynaptic neurons (white) located in S1Bf, S1body, S2, M1 and thalamus. Scale bar represents 500 μ m. (Right) Distribution of presynaptic neurons across brain structures (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

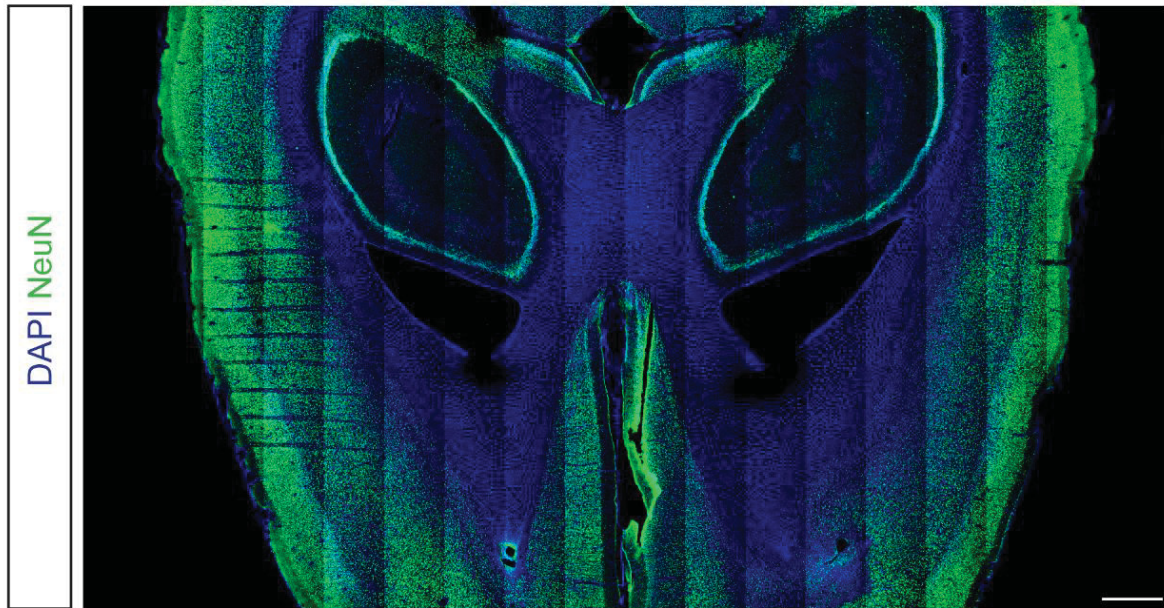
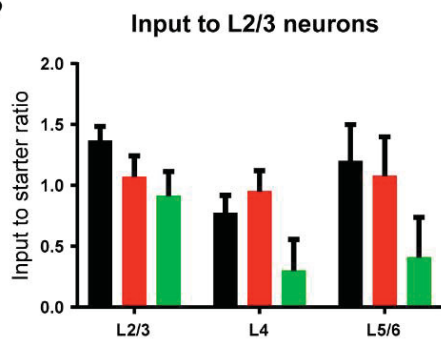
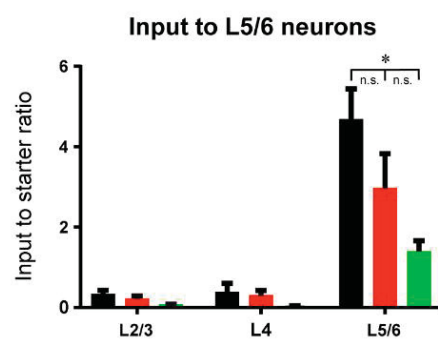
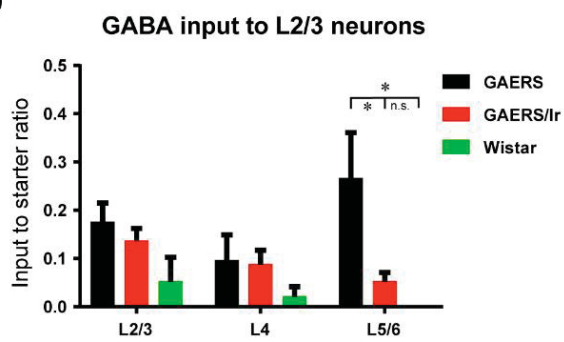
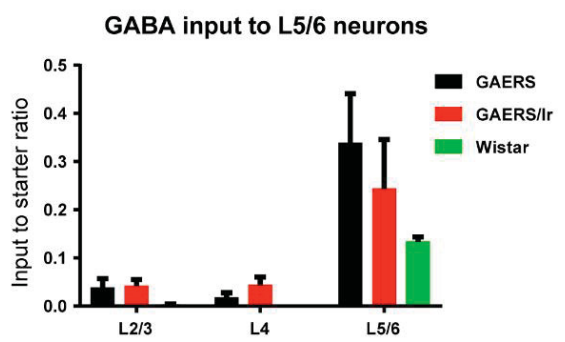
A**B****C****D****E**

Figure 4 : Effect of synchrotron microtransections on S1Bf neuronal connectivity.

(A) Example of horizontal section showing the loss of neurons (NeuN+) in the track of microtransections applied over the S1Bf of a GAERS. Scale bar represents 1 mm. (DAPI, blue; NeuN, green).

(B) RABV-mediated input tracing for S1Bf L2/3 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups) and N=4 in GAERS/Ir).

(C) RABV-mediated input tracing for S1Bf L5/6 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups) and N=4 in GAERS/Ir; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(D) RABV-mediated GABAergic input tracing for S1Bf L2/3 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups) and N=4 in GAERS/Ir; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(E) RABV-mediated GABAergic input tracing for S1Bf L5/6 starter cells (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups) and N=4 in GAERS/Ir).

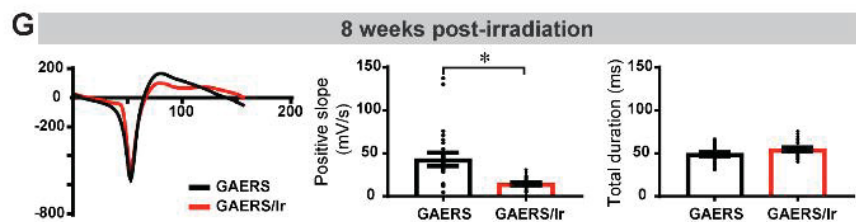
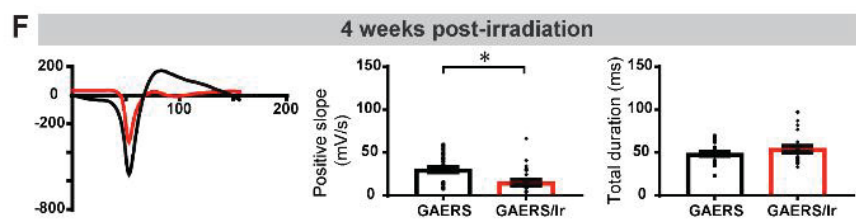
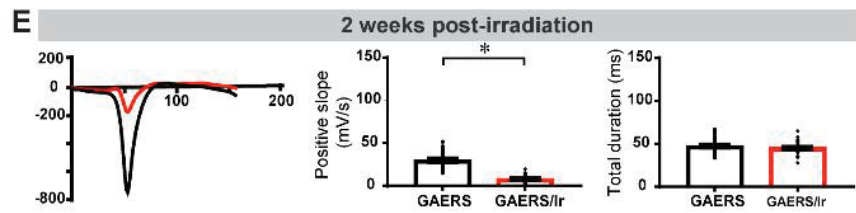
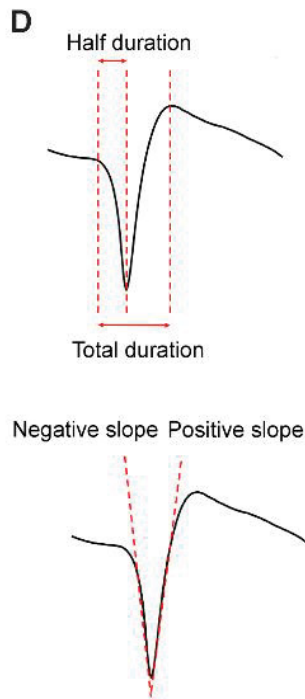
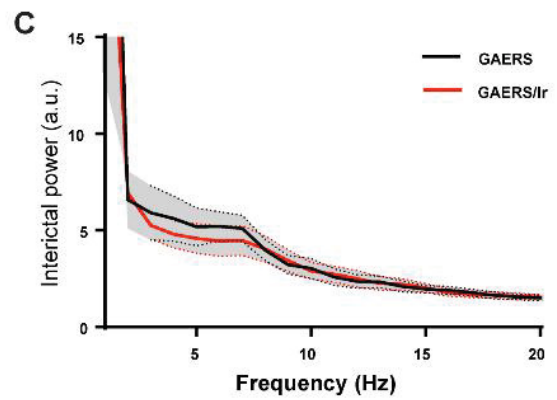
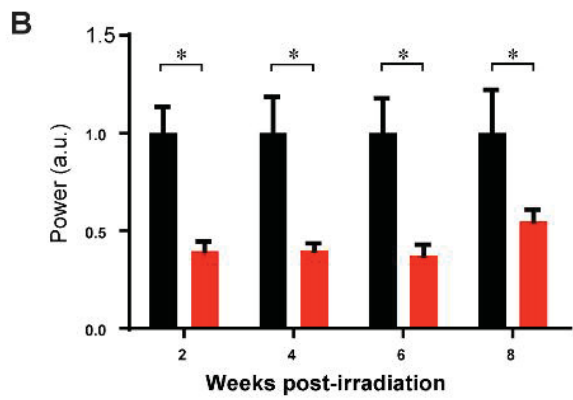
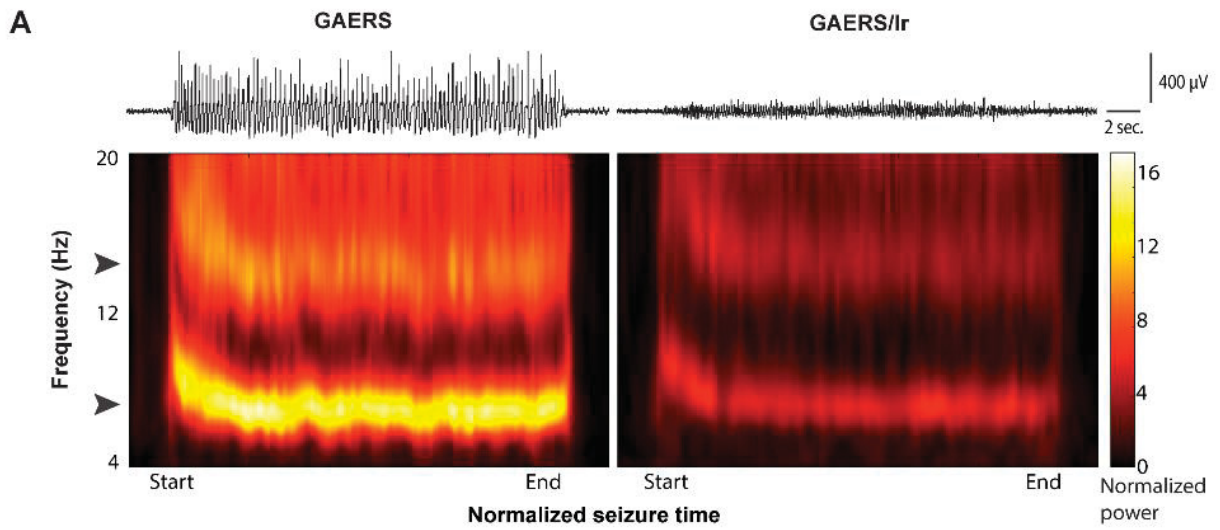


Figure 5 : ECoG *in vivo* properties of S1Bf after cortical microtransections.

(A) Mean normalized time-frequency maps of SWDs of GAERS (left, N=5 rats, n=30 SWDs) and GAERS/Ir (right, N=6 rats, n=24 SWDs) 8 weeks post-irradiation. Above: examples of SWD for each group. Arrowhead point to fundamental and first harmonic frequencies of SWDs.

(B) Mean normalized power of fundamental frequency of SWDs (6-8 Hz) (mean+SEM; N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively; n≥24 SWDs; * p≤0.05, 2way ANOVA test).

(C) Mean interictal FFT power 6 weeks after microtransection (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively).

(D) Schematic drawing of SWD pattern and corresponding parameters.

(E-G) Superimposed mean SWD waveform (left), positive slope (middle) and total duration (right) of the spike component of SWDs (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir respectively; n≥25 spikes; * p≤0.05, Mann-Whitney test).

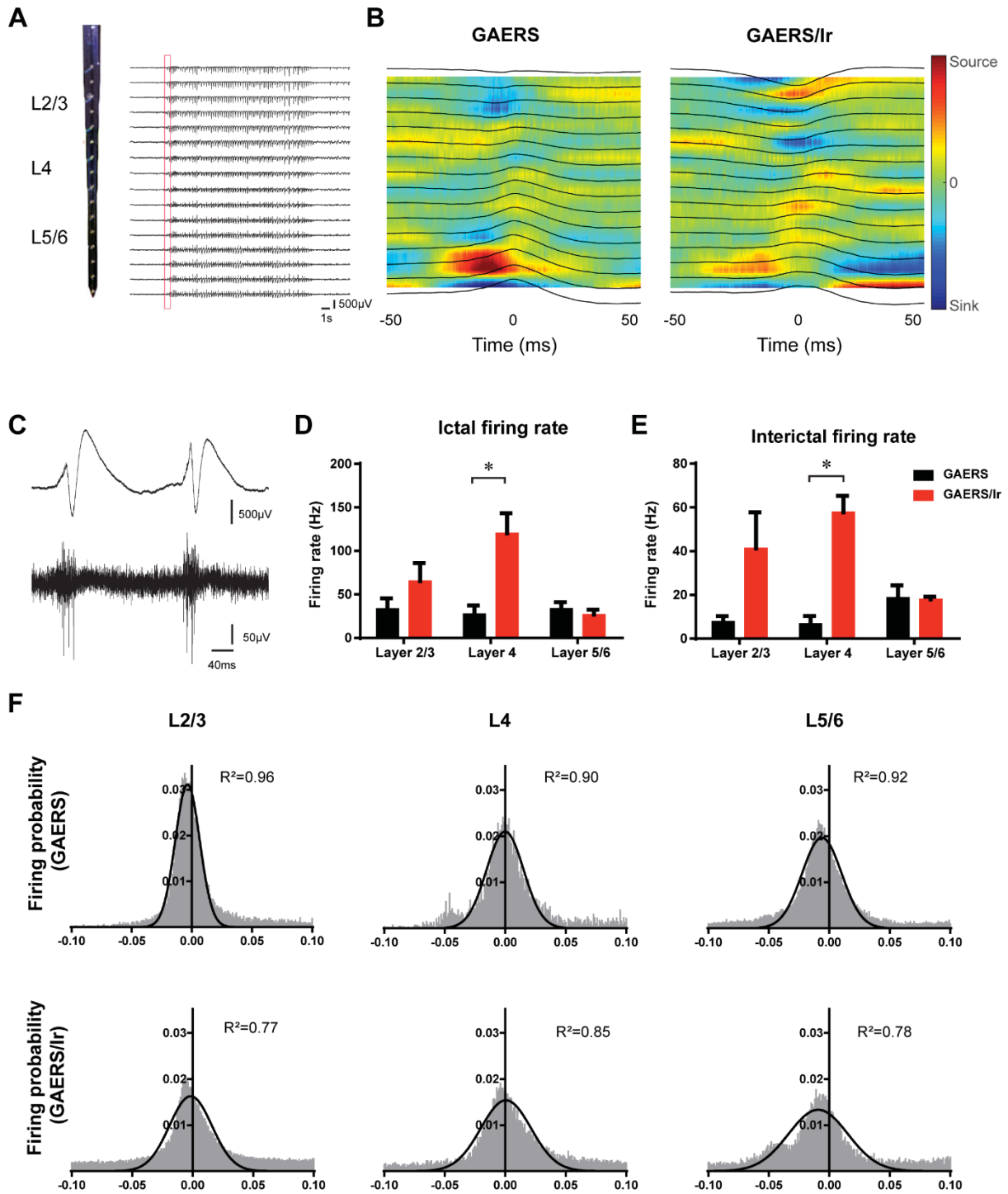


Figure 6 : Intracortical activities changes after cortical microtransections measured in vivo.

(A) Example of SWDs recorded across cortical layers with 16-contact linear silicon probes. Red line highlight the first epileptic spike as analyzed in B.

(B) Current source density map of the first spike of SWDs centered on the peak of the spike. (Average of 10 spikes).

(C) Example of intracortical recorded SWDs (above) and corresponding MUA activity (below).

(D-E) MUA activity detected during SWD (D) and outside SWD (E) (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(F) Distributions of MUA probability accross cortical layers centered on the peak of epileptic spikes. R^2 represents the Gaussian fitting coefficient. (N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively).

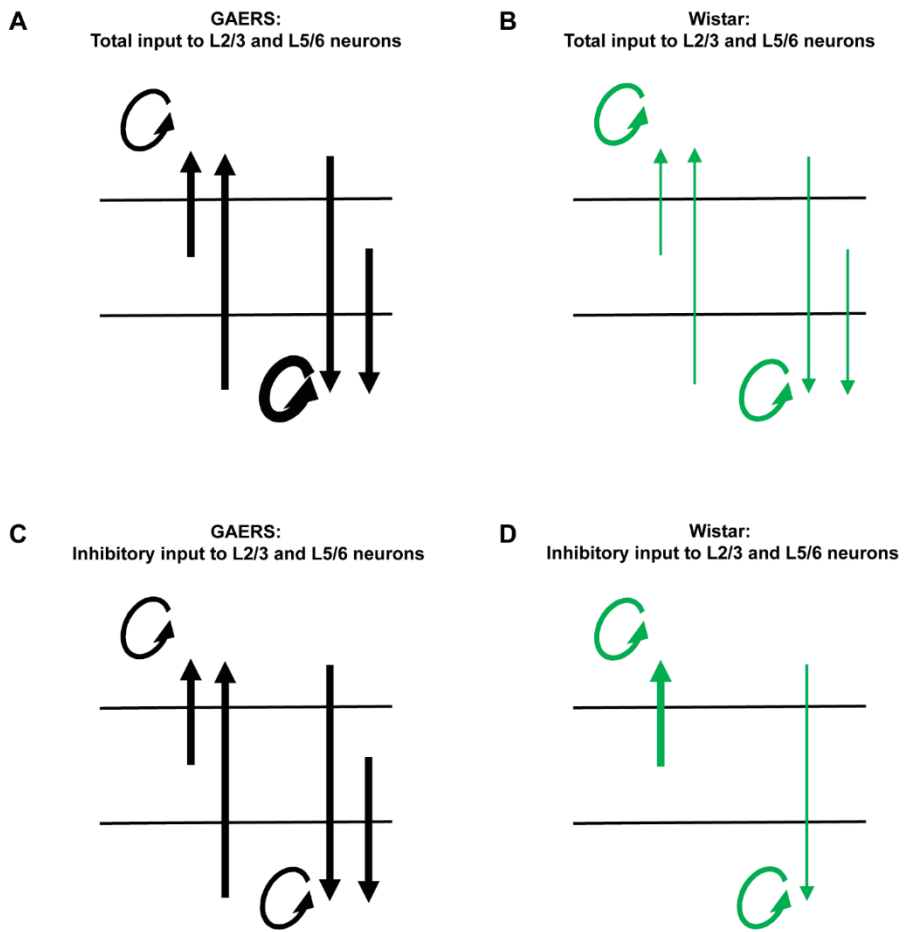
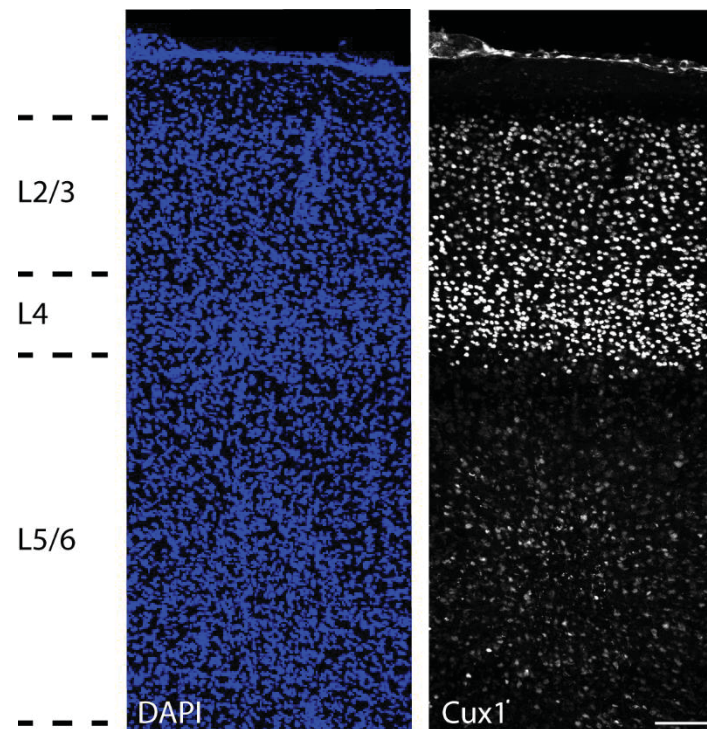
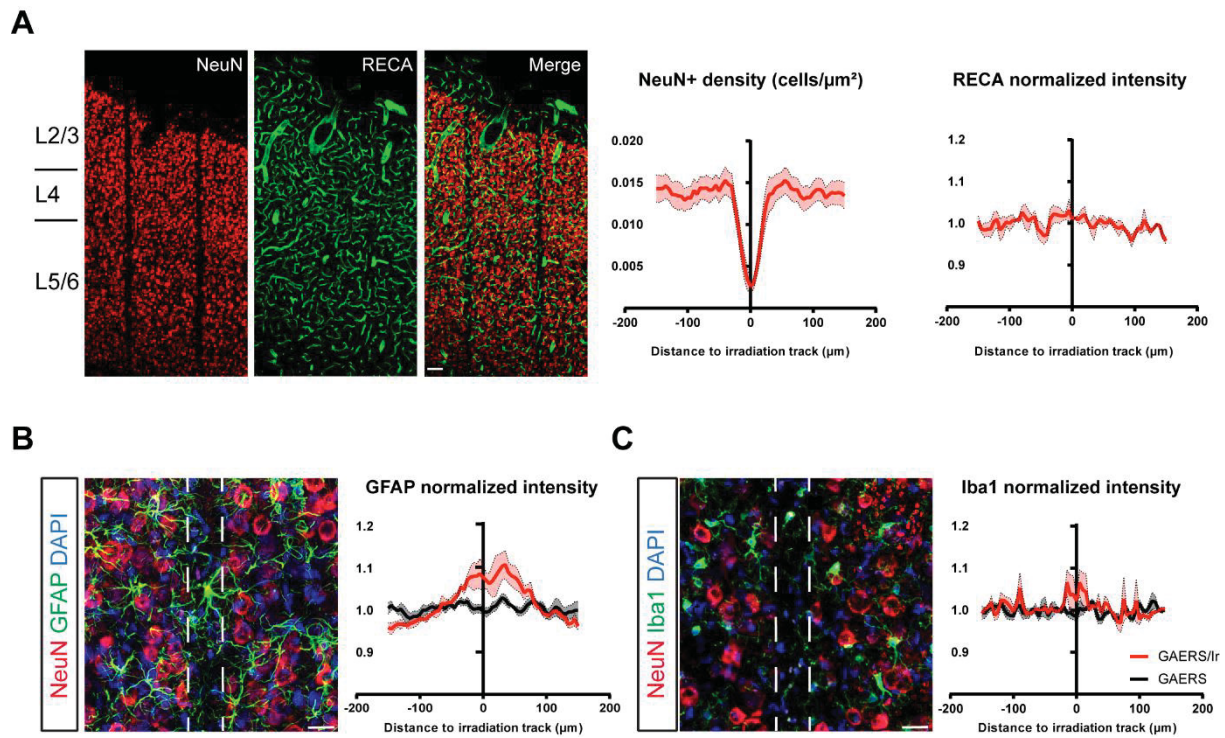


Figure 7 : Summary of structural and functional connectivity differences in S1Bf between GAERS and Wistar.



Supplementary Figure 1 : Determination of cortical layers boundaries.

S1Bf layer 4 was determined as the highest density band on DAPI stained histological sections (left). Layers above were considered as L2/3 and layers below as L5/6. This was confirmed with Cux1 staining (right), a specific marker of superficial (L2/3 and L4) cortical layers.

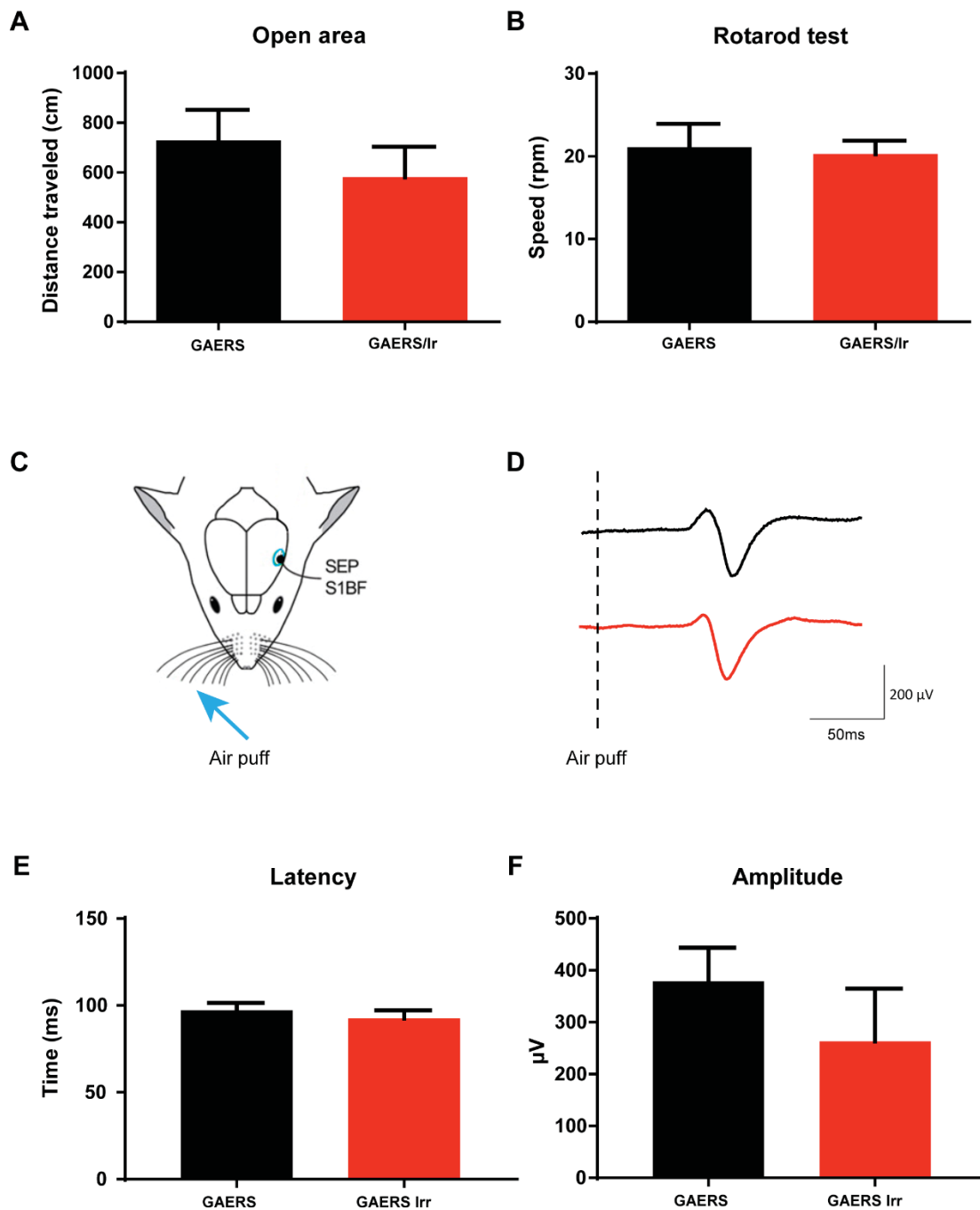


Supplementary Figure 2 : Histological effects of cortical microtransections

(A) Example of horizontal sections with neuronal (NeuN) and microvascular (RECA) staining with the quantification of cortical NeuN density and RECA normalized fluorescence intensity (GAERS/Ir, N=3 rats, n=3 sections/rats, mean+SEM). Scale bar represents 100 μm .

(B) Example of histological staining with the quantification of GFAP fluorescence intensity for GAERS/Ir (red) and GAERS (black). (N=3 rats, n=3 sections/rats, for each group; mean+SEM). Dashed lines represents the irradiation track. Scale bar represents 20 μm .

(C) Same as (B) but for Iba1 staining.



Supplementary Figure 3 : Evaluation of functional side-effects of cortical microtransections.

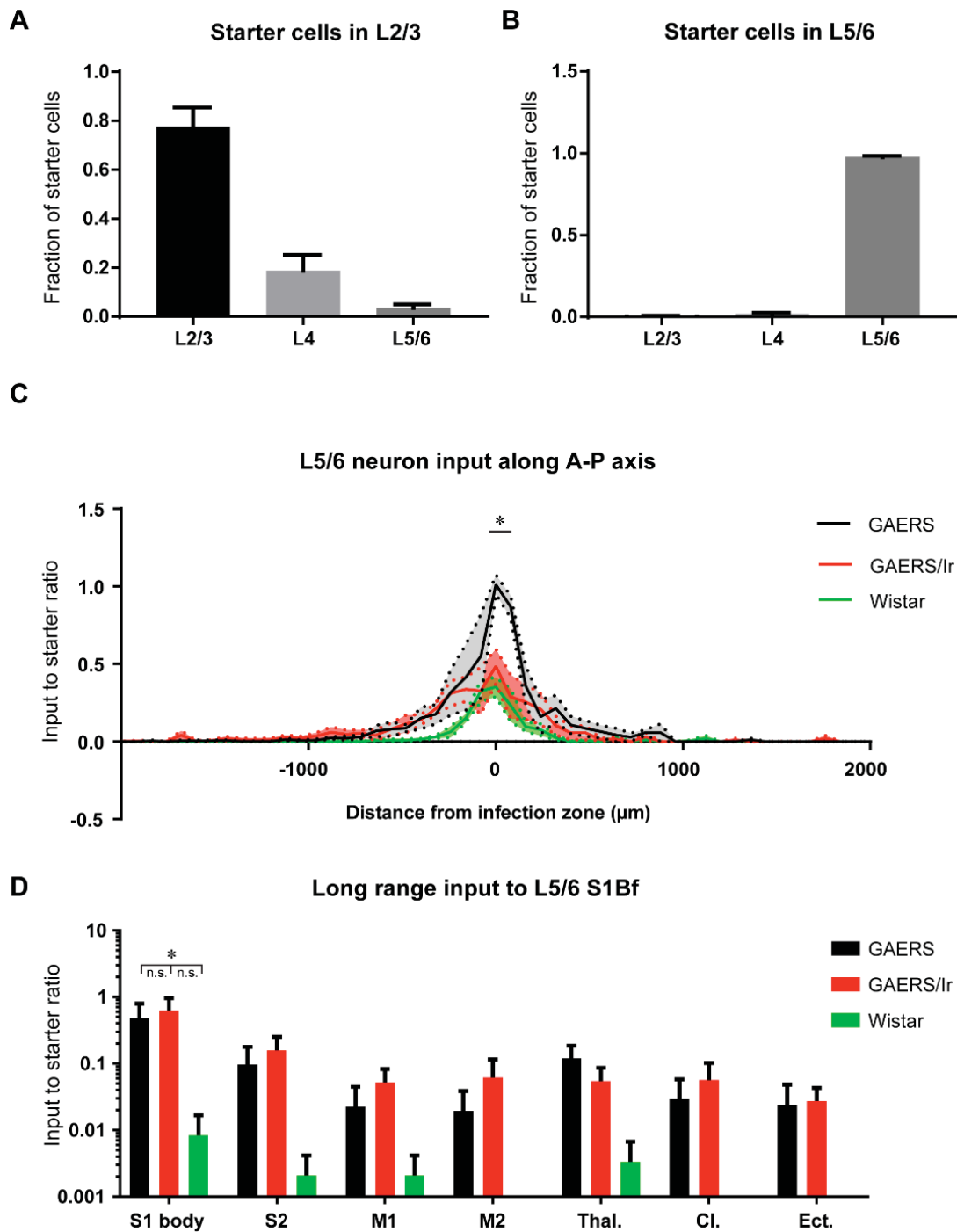
(A) Open area: locomotion performance assessment (mean+SEM) (N=7 and 9 in GAERS and GAERS/Ir respectively).

(B) Rotarod test: sensorimotor performance assessment (mean+SEM) (N=8 and 10 in GAERS and GAERS/Ir respectively).

(C) Schematic drawing of the experimental preparation allowing air-puff induced SEP recordings over S1Bf.

(D) Example traces of mean SEP evoked in GAERS (black trace) and GAERS/Ir (red trace). Dashed line represents the air-puff delivery.

(E) and **(F)** Latency and amplitude of the peak of SEP after air-puff delivery (mean+SEM) (N=4 and 5 in GAERS and GAERS/Ir respectively).

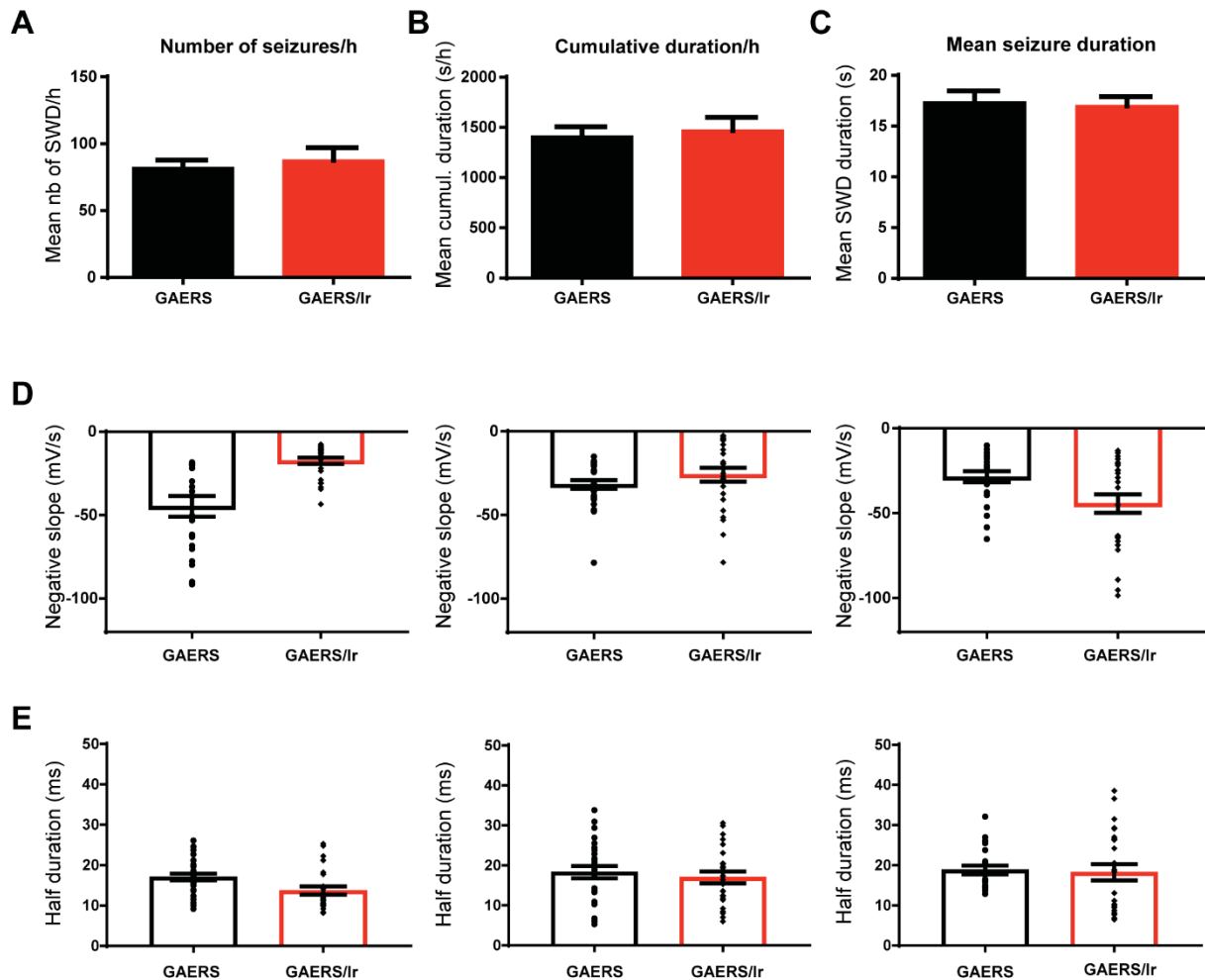


Supplementary Figure 4: RABV-mediated input tracing of S1Bf neurons after cortical microtransections.

(A-B) L2/3 and L5/6 starter cells localization across cortical layers (mean+SEM). (GAERS/Ir, N=4).

(C) Distribution of L5/6 starter cells presynaptic neurons along antero-posterior axis. (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups), N=4 in GAERS/Ir; GAERS vs. GAERS/Ir, * $p \leq 0.05$, 2way ANOVA test).

(D) Distribution of presynaptic neurons across brain structures (mean+SEM). (N=3 in GAERS and Wistar (previous groups), N=4 in GAERS/Ir; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

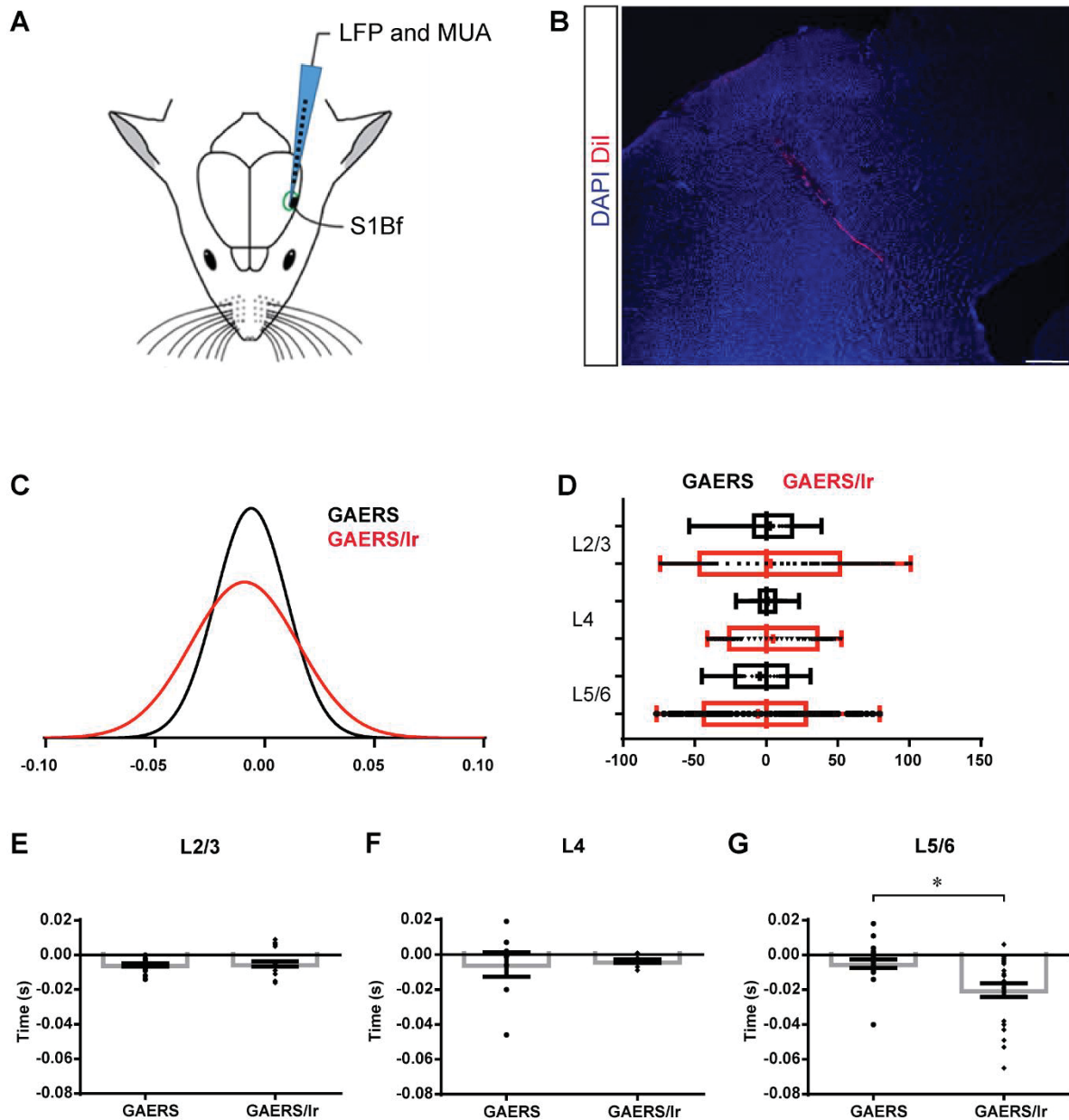


Supplementary Figure 5 : Characteristics of SWDs after cortical microtransection.

(A-C) Quantification of SWDs number and duration properties 8 weeks after cortical microtransection (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively).

(D) Negative slope of the spike component of SWDs 2 weeks (left), 4 weeks (middle) and 8 weeks (right) after cortical microtransection (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively; $n \geq 25$ spikes).

(E) Half duration of the spike component of SWDs 2 weeks (left), 4 weeks (middle) and 8 weeks (right) after cortical microtransection (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively; $n \geq 25$ spikes).



Supplementary Figure 6 : Multi-channel recordings in S1Bf.

(A) Schematic drawing of experimental set-up.

(B) Dil applied on the back of the silicon probe allow post-hoc recording-site localization. Scale bar represents 400 μm .

(C) Scheme of MUA probability centered on the peak of epileptic spikes showing an increased distribution in time after cortical microtransections.

(D) Distribution of MUA activity across cortical layers centered on the peak of epileptic spikes. (mean (short line) + median (long line) + interquartile (box plot) ; N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir, respectively).

(E-G) Latency of maximum MUA activity to peak of LFP epileptic spike (mean+SEM, N=5 and 6 in GAERS and GAERS/Ir respectively; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

Conclusion

L'ensemble de nos données confirment que les DPO sont générées au niveau du S1Bf chez le GAERS. De plus, l'initiation de l'activité paroxystique implique un circuit L5/6→L2/3→L4 de propagation entre les couches corticales. Parallèlement, la connectivité neuronale du réseau épileptique présente une hyperconnectivité intralaminaire des neurones des couches 5/6. D'autre part, il existe chez le GAERS une connectivité GABAergique importante entre les couches 5/6 et 2/3. Ces deux connectivités ne sont pas retrouvées chez le rat contrôle. Ainsi, l'initiation et la génération des DPO au sein du S1BF chez le GAERS semblent être sous-tendues par des anomalies de la connectivité qui caractérisent le réseau épileptique.

Article 2

Sensory information processing in the epileptic somatosensory cortex

F Studer, E Laghouati, G Jarre and A Depaulis

Manuscrit en préparation

Introduction

Les informations sensorielles sont traitées par des réseaux neuronaux spécialisés. Au sein de ces réseaux, le circuit canonique est la voie de traitement des informations sensorielles qui est commune à diverses aires sensorielles (Douglas et al., 1989; Douglas and Martin, 1991; Feldmeyer et al., 2013). Chez les rongeurs, les informations liées au mouvement des vibrisses sont traitées au sein du S1Bf grâce à ce circuit (Feldmeyer et al., 2013). Celui-ci est notamment favorisé par des connexions entre les neurones corticaux (Lefort et al., 2009). De nombreuses études se sont intéressées à l'intégration et à la propagation du signal sensoriel qui est notamment modulé par l'état d'éveil ou d'excitabilité dans lequel se trouve le cortex lors de la stimulation (Castro-Alamancos, 2002c; Petersen et al., 2003a; Ferezou et al., 2006, 2007).

Le GAERS est un modèle spontané d'épilepsie-absence chez le rat (Depaulis et al., 2016) et il a été montré que chez le GAERS les crises sont initiées au sein du S1Bf (Polack et al., 2007, 2009; David et al., 2008; Studer et al. in prep.). D'autre part, nous avons montré dans notre étude précédente que la génération des crises est associée à une connectivité anormale des neurones du cortex S1Bf. Or, des études menées chez le GAERS ont montré que les potentiels évoqués par stimulation des vibrisses présentaient la même amplitude et la même latence que chez le rat contrôle (Chipaux et al., 2013) et que les neurones corticaux répondaient aux stimulations (Chipaux et al., 2013; Williams et al., 2016).

L'objectif de cette étude est d'étudier la capacité d'intégration ainsi que le circuit intracortical de traitement de l'information sensorielle. Pour cela nous avons utilisé d'une part un test de discrimination de texture et d'autre part des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires in vivo pendant des stimulations des vibrisses chez le rat immobilisé.

Les résultats qui suivent font partie d'une étude en cours. Cependant, bien qu'elle ne soit pas encore finalisée, il nous semblait important de présenter ces résultats dans le cadre de cette thèse. Nous avons décidé de les présenter sous la forme d'un court manuscrit rédigé en anglais.

Manuscrit

Sensory information processing

in the epileptic somatosensory cortex

Florian Studer^{1,2}, Emel Laghouati^{1,2}, Guillaume Jarre^{1,2}, Antoine Depaulis^{1,2}

¹ Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France

² Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France

Introduction

Sensory information is processed by specialized neocortical circuits after travelling from the periphery to cortical layer 4 via the thalamus (for reviews see Feldmeyer et al., 2013; Harris and Mrsic-Flogel, 2013). Inside the cortex, the information follows a canonical circuit involved in its integration and which has been described in several sensory areas (Douglas and Martin, 1991; Douglas et al., 1989; Lefort et al., 2009). In rodents, the barrel field primary somatosensory cortex (S1Bf) performs a fine coding of the amplitude and/or direction of each whisker, therefore allowing a precise detection of the texture encountered by the animals, (Bruno et al., 2003; Kremer et al., 2011; van der Bourg et al., 2016; Estebanez et al., 2016; Kerekes et al., 2017). This part of the somatosensory cortex has become in rodents a reference to study the cortical circuits (for review see Petersen, 2007; Fox, 2018). Despite their role in physiological processes, neuronal circuits can also be involved in pathological processes as it has been shown in epilepsy (Epsztein et al., 2005; Feldt Muldoon et al., 2013).

Epilepsy is a neurological disease characterized by the recurrence of seizures (Berg et al., 2010) which are caused by a hyperexcitability and hypersynchronization of neurons (Uhlhaas and Singer, 2006). Absence-epilepsy (AE) is a genetic form of non-convulsive epilepsy where seizures are characterized by a behavioral arrest and a loss of consciousness associated with spike-and-wave discharges (SWDs) on the electroencephalogram (Loiseau et al., 1995; Garzon et al., 2016). It has been shown that SWDs are initiated in the cortex in Human patients (Holmes et al., 2004; Tucker et al., 2007; Bai et al., 2010). In two genetic models of AE in the rat, the WAG/Rij (Meeren et al., 2002; Nersesyan et al., 2004) and the GAERS (Polack et al.,

2007; David et al., 2008; Polack et al., 2009), SWDs were shown to be initiated in the primary somatosensory cortex where neurons of the deep layers are critical players in the ictogenicity (Depaulis & Charpier, 2016). More recently, we have shown in the GAERS, that SWDs are generated in the S1BF by a L5/6→L2/3→L4 pathological intracortical circuit that involves deep layer neurons hyperconnectivity (Studer et al., in prep.).

In this strain, it is possible to generate sensory-evoked potentials (SEPs) and deep layers S1 neurons seem able to respond to sensory stimulations, in line with data collected in human patients (Chipaux et al., 2013; Williams et al., 2016). Yet, it remains uncertain whether the process by which the sensory information is treated by the S1Bf cortex is the same in epileptic compared to non-epileptic rats. We hypothesized that, because of the presence of pathological neuronal connections in the S1Bf of GAERS, the intracortical sensory information processing would be impaired. Here, we aimed at understanding whether the pathological circuit initiating SWDs in GAERS interferes with the primary function of S1Bf. Therefore, we studied the intracortical sequence of sensory information propagation across cortical layers evoked by air-puff multi-whisker stimulations by the use of in vivo multi-channel silicon-probe recordings in immobilized rats. We also analyzed the ability of GAERS rats to discriminate between textures.

Materials and methods

The majority of methods are described in the previous study (Article 1). We will focus here on original methods used in this study.

Animals

We performed this study on 2-3 months old male GAERS rats and control Wistar rats of the same age, raised in similar conditions (see Studer et al, in prep).

Texture discrimination task

This test was modified from the discrimination task used in mice (Wu et al., 2013; Chen et al., 2017a, 2017b) and the novelty recognition task developed for Wistar rats (Ennaceur and Delacour, 1988). It is specific to whisker-related information processing as whiskers and S1Bf have to be intact for the rat to be able to perform correctly (Wu et al., 2013; Chen et al.,

2017a). The protocol and its time-line are shown in Figure 3A. This test was carried-out in a 50 x 50 x 50 cm arena. On day 1, rats were individually habituated to the arena for 10 min. On day 2, two columns of 5 x 6 x 9 cm with identical textures were placed in opposite corners of the arena. The rat was placed in the center of the arena and left for 5 min of familiarization to the texture of the two columns (encoding phase). The rat was then removed from the arena and placed for 5 min in its home cage (consolidation phase). The two columns were replaced by two other ones of the same shape and color, one with the same texture as during the encoding phase and the other with a new texture. The rat was given 3 min to explore the new columns (testing phase). The texture used were composed of sandpapers of either 50 or 120 grit (Diall, Castorama, France). The location of the columns and the familiar and novel textures were randomly changed to avoid biases. The tests were video-recorded and analyzed by an observer blind to the animal's strain. The exploration of the familiar and novel texture was determined as approaches with the nose of the rat in a 4-cm square area around the columns being considered as the contact zone. The discrimination index was calculated as the time spent exploring the column with the novel texture minus the time spent exploring the familiar texture divided by the total time of column exploration. The time that rats spent touching the object with their body was not counted. Rats were included in the analysis only if they spent more than 10 seconds of total exploration during each phase.

Locomotion and anxiety-like behavior tests

Rats were individually placed in an open-arena (50 x 100 cm) artificially divided in a central zone (25 x 75 cm) and an external zone corresponding to a 12.5 cm stripe between the central zone and the wall of the arena. The test was recorded by a video-tracking system (ViewPoint, Civrioux, France) for 10 minutes. The locomotion was quantified as the total distance travelled during the 10 minutes of the test. The number of entries and the total time spent in the central zone were quantified to evaluate anxiety-like behavior.

Results

Sensory-evoked potentials are delayed in GAERS

Because the S1Bf of GAERS present an abnormal neuronal connectivity that is associated with the initiation and propagation of pathological oscillations (Studer et al., in prep.), it became necessary to investigate its functionality, i.e. coding and integration of sensory information

mediated by the whiskers. To further determine whether GAERS' S1Bf codes whisker-mediated information as in Wistar rats, we first analyzed the characteristics of the peak of ECoG-recorded sensory-evoked potentials (SEPs), i.e. latency and amplitude, after whisker stimulations by air puff in immobilized rats (Figure 1A and B). The peak amplitudes of SEPs were not different between GAERS and Wistar controls although we observed a higher variability in Wistar rats (mean amplitude= $378.4 \pm 65.1 \mu\text{V}$ and $295.6 \pm 122 \mu\text{V}$ in GAERS (N=4 rats) and Wistar (N=4 rats), respectively; Mann-Whitney test, $p=0.88$) (Figure 1D). However, the latency was slightly longer in GAERS than in Wistar rat although this difference did not reach significance (mean latency= $97.25 \pm 4.19 \text{ ms}$ and $82 \pm 3.58 \text{ ms}$ in GAERS (N=4 rats) and Wistar rats (N=4 rats), respectively; Mann-Whitney test, $p=0.057$, n.s.) (Figure 1C).

We next further examined the intracortical circuit of sensory information processing in GAERS' S1Bf by recording local field potential (LFP) activity among cortical layers using multi-channel silicon probes (Figure 1A). This allowed us to verify if SEPs were processed by the canonical circuit and/or whether the SWDs circuit, i.e. L5/6→L2/3→L4 interferes with the coding of whisker-mediated information. To this aim, we analyzed the evoked intracortical SEPs by current-source density analysis and determine the sequence of current-source activity upon air puff stimulation. In Wistar rats (N=4), we first observed in L4 a sink associated with a local source that was followed by a similar dipole in L2/3 and then in L5, in agreement with the canonical circuit and previous reports (Reyes-Puerta et al., 2015; van der Bourg et al., 2016) (Figure 1E). In these animals, we also observed a late source in L2/3 corresponding to an increased inhibitory activity about 280 ms after the whiskers stimulation (Figure 1E). In GAERS (N=4), we observed a similar sequence although with a delay of a few milliseconds and with a more pronounced dipole of current, i.e. more local activity, in L5/6 when compared to Wistar controls (Figure 1F). In addition, we observed a sink about 350 ms after the whiskers stimulation (Figure 1F) suggesting an increased neuronal activation especially in L2/3 neurons.

Our data suggest that the canonical circuit of sensory processing in GAERS' S1Bf functions similarly to control conditions but that the evoked responses are delayed when compared to Wistar controls.

Sensory evoked neuronal activity is delayed and increased in GAERS

In order to confirm the LFP sequence of activation after multi-whisker stimulation, we analyzed the response to air-puff delivery on neuronal multi-unit activity (MUA) among cortical layers of the S1Bf. As expected, in Wistar rats (N=4) we observed a general increase of MUA with a peak at 90 ms post-stimulation, in line with our CSD analysis, as shown by the grand-average peristimulus time histogram (PSTH) representing the mean activity of all layers (Figure 2A). Of note, the mean firing rate among cortical layers was around 100 Hz (Figure 2A). In GAERS (N=4), calculation of the grand-average PSTH revealed a first peak of MUA at 95 ms after the stimulation, as for Wistar rats but with a slight delay (≈ 5 ms), followed by a second and higher peak at 360 ms (Figure 3B) in coherence with the observed late sink on the CSD map (Figure 1F). The baseline mean firing rate among cortical layers was about 60 Hz for GAERS (Figure 2B). Z scored PSTH maps confirmed these peaks of activity among cortical layers and further described the selective response of neurons in the different cortical layers (Figure 2B). In Wistar (N=4), MUA increase was first present in L4, then L2/3 and finally L5 (Figure 2B, left). In GAERS, the MUA increase during the first peak was first present in L4 before spreading to L2/3. L5 and L6 did not show a particular increase of neuronal activity. During the second peak, MUA increase appeared first in L5 before spreading to L4 and finally to L2/3 (Figure 2B, right).

The general evoked MUA activity (0-150 ms) was similar in Wistar rats and GAERS except for L5/6 neurons where it was significantly decreased in GAERS vs. Wistar rats (mean L5/6 firing rate = 0.12 ± 0.04 Z score and 0.55 ± 0.08 Z score in GAERS (N=4) and Wistar (N=4), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) (Figure 2C). In Wistar rats, during the first peak (70-100 ms), the most important increase of activity was located in L4 and L5 (Figure 2D) as previously suggested by the CSD analysis of LFP (Figure 1E) whereas in GAERS, it was mostly located in L2/3 and L4 (Figure 2B and D). The neuronal response was more important in Wistar rats than in GAERS in all layers (Figure 2D, GAERS (N=4) vs. Wistar (N=4), Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$). During the second peak (330-390 ms), activity of L4 and L2/3 neurons in GAERS were the most increased (Figure 2B). This second peak appears specific to GAERS as no increase of MUA was detected in Wistar rats (Figure 2B and E, GAERS (N=4) vs. Wistar (N=4), Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$). Of note, L5 neurons in GAERS rats displayed a continuous high-frequency activity that

was not present in Wistar rats (data not-shown), in line with our previous observation (Polack et al., 2007).

Altogether, our results show that the neuronal activity evoked in S1Bf by whiskers stimulation is different in GAERS compared to Wistar controls and although the sequence of neuronal activations across layers in GAERS follow the canonical circuit, our data revealed a delay in the neuronal response to air puff and the existence of a second phase of neuronal activity about 200 ms after the first one.

GAERS rats are able to discriminate between textures

Although sensory processing in GAERS seems to involve the canonical circuit in S1Bf cortex, the delayed and secondary responses to whisker stimulation, especially in neuronal activity suggested the possibility of a dysfunction of the animals' ability to discriminate between textures. This was an important question to address as AE has been associated with cognitive dysfunction in human patients (Ott et al., 2003; Caplan et al., 2008) and such sensory impairment could, at least in part, explain the emotional comorbidities observed in GAERS (Jones et al., 2008). Therefore, we investigated whether sensory integration is still functional in these animals by using a behavioral test of texture discrimination (Figure 3A) in which the integrity of the whisker-related pathway of sensory processing is mandatory (Wu et al., 2013; Chen et al., 2017a, 2017b). GAERS and Wistar rats were both able to discriminate between the two proposed textures as they spent more time exploring the new texture during the testing phase (Figure 3B-D) (mean percentage of time exploring new object = 72.31 ± 2.96 % and 67.92 ± 3.13 % in GAERS (N=6) and Wistar (N=9), respectively; Wilcoxon Signed Rank test against 50% chance level, $p \leq 0.05$). We found no differences between performance of GAERS and Wistar rats in this task (mean discrimination index = 0.45 ± 0.06 and 0.36 ± 0.06 in GAERS (N=6) and Wistar (N=9), respectively; Mann-Whitney test, $p = 0.43$, n.s.) (Figure 3E).

To verify that these results were not biased by a decreased locomotion and/or increased anxiety-like behavior, as suggested by previous reports in GAERS (Jones et al., 2008), we monitored the locomotor activity of GAERS and Wistar rats in an open-field (50x100 cm) (Figure 3F). The total distance travelled during 10 min was not different between GAERS and Wistar rats (mean travelled distance = $3,020 \pm 154$ cm and $2,659 \pm 304$ cm in GAERS (N=8) and Wistar rats (N=9), respectively; Mann-Whitney test, $p = 0.4$, n.s.) (Figure 3G). GAERS spent

more time in the central area (mean time spent in central area= 24.7 ± 4.7 s and 11.1 ± 1.8 s in GAERS (N=8) and Wistar (N=9), respectively ; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) and entered more frequently in this zone (mean entry number= 26.5 ± 4.7 and 11.4 ± 2.3 in GAERS (N=8) and Wistar (N=9), respectively; Mann-Whitney test, $p \leq 0.05$) (Figure 3H) suggesting a reduced anxiety-like behavior in GAERS when compared to Wistar controls.

Our data further confirm that despite its critical involvement in SWD initiation and the presence of a pathological network and delay and changes in sensory-evoked neuronal activity, the S1Bf in GAERS is still able to process and integrate whisker-related sensory information.

Discussion

Sensory processing involves specific neocortical circuits. Here, we show that despite the presence of pathological activities and neuronal connections, the circuits of S1Bf of GAERS rats are still able to process whisker-related information. Indeed, we showed that GAERS are able to integrate and remember thin texture differences and that the intracortical processing involves the canonical circuit as for Wistar rats. However, our data revealed a delay in this information processing and the existence of a neuronal activity rebound in GAERS which could be the consequence of the deep layer hyperconnectivity described in these animals.

To evaluate the sensory integration capacity in GAERS, we chose a basic discrimination task for several reasons. As it is not an associative test, it does not require any training of the rats and therefore is not dependent on motivational aspects or learning processes (Grayson et al., 2015). This is important especially in AE which has been shown to be associated with comorbidities such as cognition deficits in patients (Wirrell et al., 1997; Caplan et al., 2008). This choice was also motivated by data suggesting that GAERS present an anhedonic behavior, as evidenced in the sucrose preference test (Jones et al., 2008). This could have been a confounding factor in associative tests where motivation can be critical. Because an increase of anxiety-like behavior has also been described in GAERS (Jones et al., 2008) that could have influenced our discrimination test, we examined the time spent in the central arena of an open space. Our data rather indicate a reduce fear in GAERS when compared to Wistar rats, in line with previous reports (Vergnes et al., 1991; Marques-Carneiro et al., 2014). This difference

may be due to variabilities among environmental conditions and/or genetic drift in the strains of GAERS used in the different studies, as evidenced recently (Powell et al., 2014).

Whisker stimulation induce SEP of normal properties in GAERS even though a delay of occurrence seems to be present in GAERS when compared to Wistar rats both on LFP (Figure 1) and MUA recordings (Figure 2). This delay could be due to an interference of the pathological circuit previously described (Studer et al. 2018). Especially, GABAergic connections seem to be different in the S1Bf network in GAERS, suggesting an increased inhibition that could, at least in part, explain the delayed response after whisker deflection. Nevertheless, GAERS are able to discriminate textures suggesting that the primary function of S1Bf is preserved despite the presence of pathological neuronal synchronization processes, in coherence with previous studies (Chipaux et al., 2013). In addition, they reveal the existence of a second wave of neuronal activity about 400 ms after the stimulation. This activity could be used as a reinforcement allowing a better encoding of the sensory information, as observed in other sensory cortices (Bermudez Contreras et al., 2013; Rothschild et al., 2017). Such secondary activity has been reported to be linked with a sensory-motor top-down circuit in the S1 of mice (Manita et al., 2015) and highlight the necessity of looking at learning and sensorimotor interaction to better understand sensory integration (Crochet and Petersen, 2015). Our data suggest that this second wave is generated in L5, a finding that is in line with recent studies showing that neurons of this layer are able to synchronize the cortical column and to generate cortical waves (Sakata and Harris, 2009; Beltramo et al., 2013; Stroh et al., 2013). It is also in agreement with our previous data showing that deep layer neurons are hyperexcitable in the GAERS (Polack et al., 2007; Williams et al., 2016) and that these neurons have increased connections within the same layer and towards L2/3 (Studer et al, in prep).

Fundings

This work was supported by funding from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) and grants from the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR, « EPIRAD » # 13-BSV1-0012-01 2013 and « SoAbsence » #16-CE37-0021 2016). FS received support from the *Ligue Française contre l'Epilepsie* and Grenoble Alpes University.

Acknowledgements:

We thank S Andrieu, C Colomb and all the staff of the GIN animal facility for animal care. We thank S Carnicella for his advices about behavioral tests.

References

- Bai, X., Vestal, M., Berman, R., Negishi, M., Spann, M., Vega, C., Desalvo, M., Novotny, E.J., Constable, R.T., and Blumenfeld, H. (2010). Dynamic Time Course of Typical Childhood Absence Seizures: EEG, Behavior, and Functional Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* 30, 5884–5893.
- Beltramo, R., D’Urso, G., Dal Maschio, M., Farisello, P., Bovetti, S., Clovis, Y., Lassi, G., Tucci, V., De Pietri Tonelli, D., and Fellin, T. (2013). Layer-specific excitatory circuits differentially control recurrent network dynamics in the neocortex. *Nat. Neurosci.* 16, 227–234.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51, 676–685.
- Bermudez Contreras, E.J., Schjetnan, A.G.P., Muhammad, A., Bartho, P., McNaughton, B.L., Kolb, B., Gruber, A.J., and Luczak, A. (2013). Formation and reverberation of sequential neural activity patterns evoked by sensory stimulation are enhanced during cortical desynchronization. *Neuron* 79, 555–566.
- van der Bourg, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Laurency, B., Wieckhorst, M., Stüttgen, M.C., Luhmann, H.J., and Helmchen, F. (2016). Layer-Specific Refinement of Sensory Coding in Developing Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex*.
- Bruno, R.M., Khatri, V., Land, P.W., and Simons, D.J. (2003). Thalamocortical angular tuning domains within individual barrels of rat somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9565–9574.
- Caplan, R., Siddarth, P., Stahl, L., Lanphier, E., Vona, P., Gurbani, S., Koh, S., Sankar, R., and Shields, W.D. (2008). Childhood absence epilepsy: Behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 49, 1838–1846.
- Chen, C.-C., Lu, J., Yang, R., Ding, J.B., and Zuo, Y. (2017a). Selective activation of parvalbumin interneurons prevents stress-induced synapse loss and perceptual defects. *Mol. Psychiatry*.
- Chen, K., Zhang, L., Tan, M., Lai, C.S.W., Li, A., Ren, C., and So, K.-F. (2017b). Treadmill exercise suppressed stress-induced dendritic spine elimination in mouse barrel cortex and improved working memory via BDNF/TrkB pathway. *Transl. Psychiatry* 7, tp201741.

- Chipaux, M., Vercueil, L., Kaminska, A., Mahon, S., and Charpier, S. (2013). Persistence of Cortical Sensory Processing during Absence Seizures in Human and an Animal Model: Evidence from EEG and Intracellular Recordings. *PLOS ONE* 8, e58180.
- Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2015). Cortical Sensorimotor Reverberations. *Neuron* 86, 1116–1118.
- David, O., Guillemain, I., SAILLET, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., and Depaulis, A. (2008). Identifying Neural Drivers with Functional MRI: An Electrophysiological Validation. *PLoS Biol.* 6, e315.
- Douglas, R.J., and Martin, K.A. (1991). A functional microcircuit for cat visual cortex. *J. Physiol.* 440, 735–769.
- Douglas, R.J., Martin, K.A.C., and Whitteridge, D. (1989). A Canonical Microcircuit for Neocortex. *Neural Comput.* 1, 480–488.
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.
- Epszstein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., and Crépel, V. (2005). Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *J. Neurosci.* 25, 8229–8239.
- Estebanez, L., Bertherat, J., Shulz, D.E., Bourdieu, L., and Léger, J.-F. (2016). A radial map of multi-whisker correlation selectivity in the rat barrel cortex. *Nat. Commun.* 7, 13528.
- Feldmeyer, D., Brecht, M., Helmchen, F., Petersen, C.C.H., Poulet, J.F.A., Staiger, J.F., Luhmann, H.J., and Schwarz, C. (2013). Barrel cortex function. *Prog. Neurobiol.* 103, 3–27.
- Feldt Muldoon, S., Soltesz, I., and Cossart, R. (2013). Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3567–3572.
- Fox, K. (2018). Deconstructing the Cortical Column in the Barrel Cortex. *Neuroscience* 368, 17–28.
- Garzon, P., Lemelle, L., and Auvin, S. (2016). Épilepsie absence de l'enfant : actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Arch. Pédiatrie* 23, 1176–1183.
- Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., and Neill, J.C. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav. Brain Res.* 285, 176–193.
- Harris, K.D., and Mrsic-Flogel, T.D. (2013). Cortical connectivity and sensory coding. *Nature* 503, 51–58.
- Holmes, M.D., Brown, M., and Tucker, D.M. (2004). Are “Generalized” Seizures Truly Generalized? Evidence of Localized Mesial Frontal and Frontopolar Discharges in Absence. *Epilepsia* 45, 1568–1579.

- Jones, N.C., Salzberg, M.R., Kumar, G., Couper, A., Morris, M.J., and O'Brien, T.J. (2008a). Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp. Neurol.* 209, 254–260.
- Kerekes, P., Daret, A., Shulz, D.E., and Ego-Stengel, V. (2017). Bilateral Discrimination of Tactile Patterns without Whisking in Freely Running Rats. *J. Neurosci.* 37, 7567–7579.
- Kremer, Y., Léger, J.-F., Goodman, D., Brette, R., and Bourdieu, L. (2011). Late Emergence of the Vibrissa Direction Selectivity Map in the Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 31, 10689–10700.
- Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J.-C., and Petersen, C.C.H. (2009). The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron* 61, 301–316.
- Loiseau, P., Duche, B., and Pédespan, J.-M. (1995). Absence epilepsies. *Epilepsia* 36, 1182–1186.
- Manita, S., Suzuki, T., Homma, C., Matsumoto, T., Odagawa, M., Yamada, K., Ota, K., Matsubara, C., Inutsuka, A., Sato, M., et al. (2015). A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. *Neuron* 86, 1304–1316.
- Marques-Carneiro, J.E., Faure, J.-B., Cosquer, B., Koning, E., Ferrandon, A., de Vasconcelos, A.P., Cassel, J.-C., and Nehlig, A. (2014). Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control. *Epilepsia* 55, 1460–1468.
- Meeren, H.K.M., Pijn, J.P.M., Van Luijckelaar, E.L.J.M., Coenen, A.M.L., and Lopes da Silva, F.H. (2002). Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1480–1495.
- Nersesyan, H., Herman, P., Erdogan, E., Hyder, F., and Blumenfeld, H. (2004). Relative Changes in Cerebral Blood Flow and Neuronal Activity in Local Microdomains during Generalized Seizures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1057–1068.
- Ott, D., Siddarth, P., Gurbani, S., Koh, S., Tournay, A., Shields, W.D., and Caplan, R. (2003). Behavioral Disorders in Pediatric Epilepsy: Unmet Psychiatric Need. *Epilepsia* 44, 591–597.
- Petersen, C.C.H. (2007). The Functional Organization of the Barrel Cortex. *Neuron* 56, 339–355.
- Polack, P.-O., Guillemain, I., Hu, E., Deransart, C., Depaulis, A., and Charpier, S. (2007). Deep Layer Somatosensory Cortical Neurons Initiate Spike-and-Wave Discharges in a Genetic Model of Absence Seizures. *J. Neurosci.* 27, 6590–6599.
- Polack, P.-O., Mahon, S., Chavez, M., and Charpier, S. (2009). Inactivation of the Somatosensory Cortex Prevents Paroxysmal Oscillations in Cortical and Related Thalamic Neurons in a Genetic Model of Absence Epilepsy. *Cereb. Cortex* 19, 2078–2091.
- Powell, K.L., Tang, H., Ng, C., Guillemain, I., Dieuset, G., Dezsí, G., Çarçak, N., Onat, F., Martin, B., O'Brien, T.J., et al. (2014). Seizure expression, behavior, and brain morphology

differences in colonies of Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg. *Epilepsia* 55, 1959–1968.

Reyes-Puerta, V., Sun, J.-J., Kim, S., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2015). Laminar and Columnar Structure of Sensory-Evoked Multineuronal Spike Sequences in Adult Rat Barrel Cortex In Vivo. *Cereb. Cortex* 25, 2001–2021.

Rothschild, G., Eban, E., and Frank, L.M. (2017). A cortical–hippocampal–cortical loop of information processing during memory consolidation. *Nat. Neurosci.* 20, 251–259.

Sakata, S., and Harris, K.D. (2009). Laminar Structure of Spontaneous and Sensory-Evoked Population Activity in Auditory Cortex. *Neuron* 64, 404–418.

Stroh, A., Adelsberger, H., Groh, A., Rühlmann, C., Fischer, S., Schierloh, A., Deisseroth, K., and Konnerth, A. (2013). Making Waves: Initiation and Propagation of Corticothalamic Ca²⁺ Waves In Vivo. *Neuron* 77, 1136–1150.

Tucker, D.M., Brown, M., Luu, P., and Holmes, M.D. (2007). Discharges in ventromedial frontal cortex during absence spells. *Epilepsy Behav.* 11, 546–557.

Uhlhaas, P.J., and Singer, W. (2006). Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology. *Neuron* 52, 155–168.

Vergnes, M., Marescaux, C., Boehrer, A., and Depaulis, A. (1991). Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res.* 9, 97–104.

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

Wirrell, E.C., Camfield, C.S., Camfield, P.R., Dooley, J.M., Gordon, K.E., and Smith, B. (1997). Long-term Psychosocial Outcome in Typical Absence Epilepsy: Sometimes a Wolf in Sheeps' Clothing. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 151, 152–158.

Wu, H.-P.P., Ioffe, J.C., Iverson, M.M., Boon, J.M., and Dyck, R.H. (2013). Novel, whisker-dependent texture discrimination task for mice. *Behav. Brain Res.* 237, 238–242.

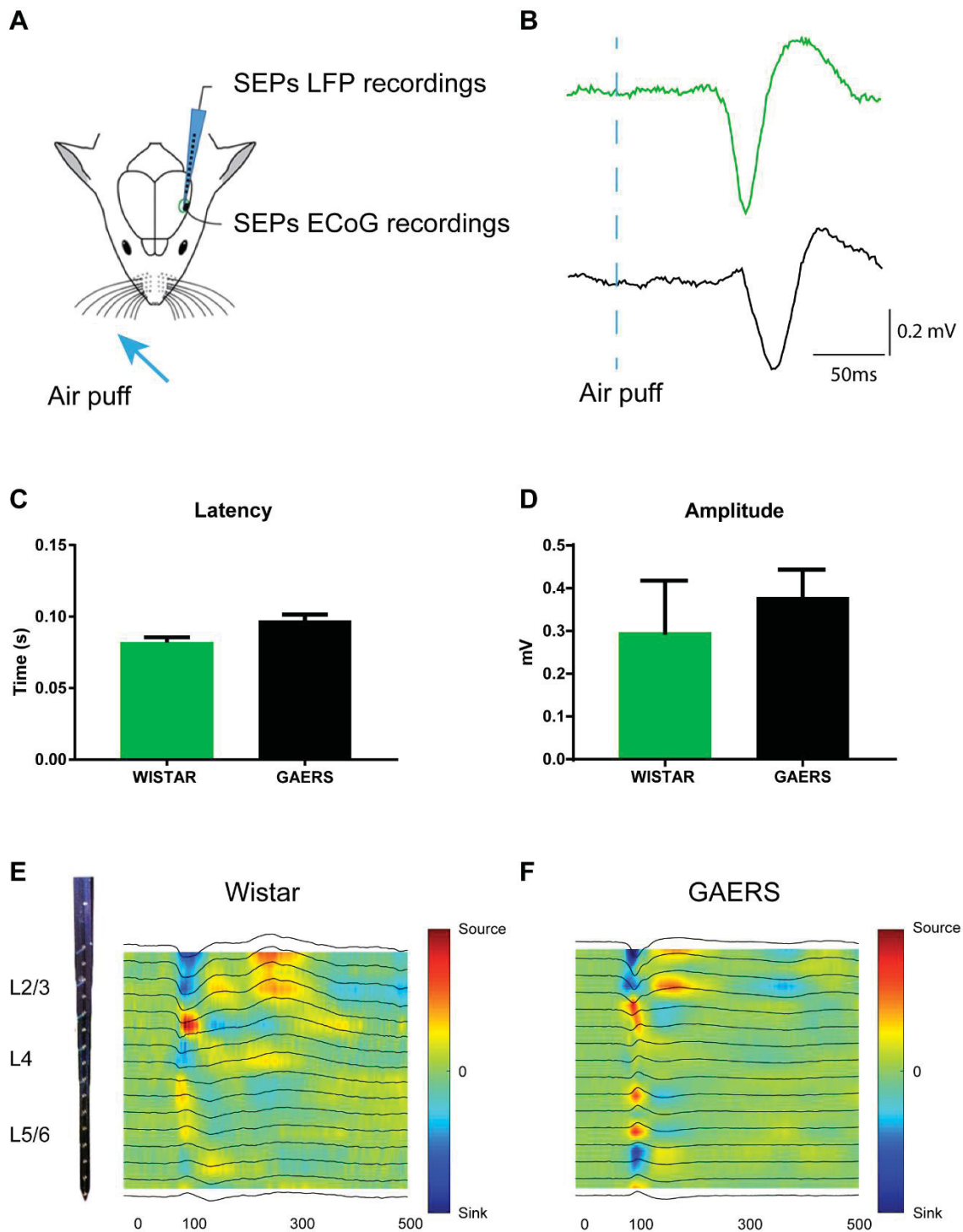


Figure 1 : Sensory evoked LFP activity in the S1Bf.

(A) Schematic drawing of the experimental preparation allowing air-puff induced SEP recordings over S1Bf.

(B) Example traces of mean SEP evoked in Wistar (green trace) and GAERS (black trace). Dashed line represents the air-puff delivery.

(C-D) Latency and amplitude of the peak of SEP after air-puff delivery (mean+SEM) (N=4 for Wistar and GAERS; n.s., Mann-Whitney test).

(E-F) Example of CSD maps of average SEP among cortical layers with 16-contact linear silicon probes (N=4 rats, n \geq 35 SEP).

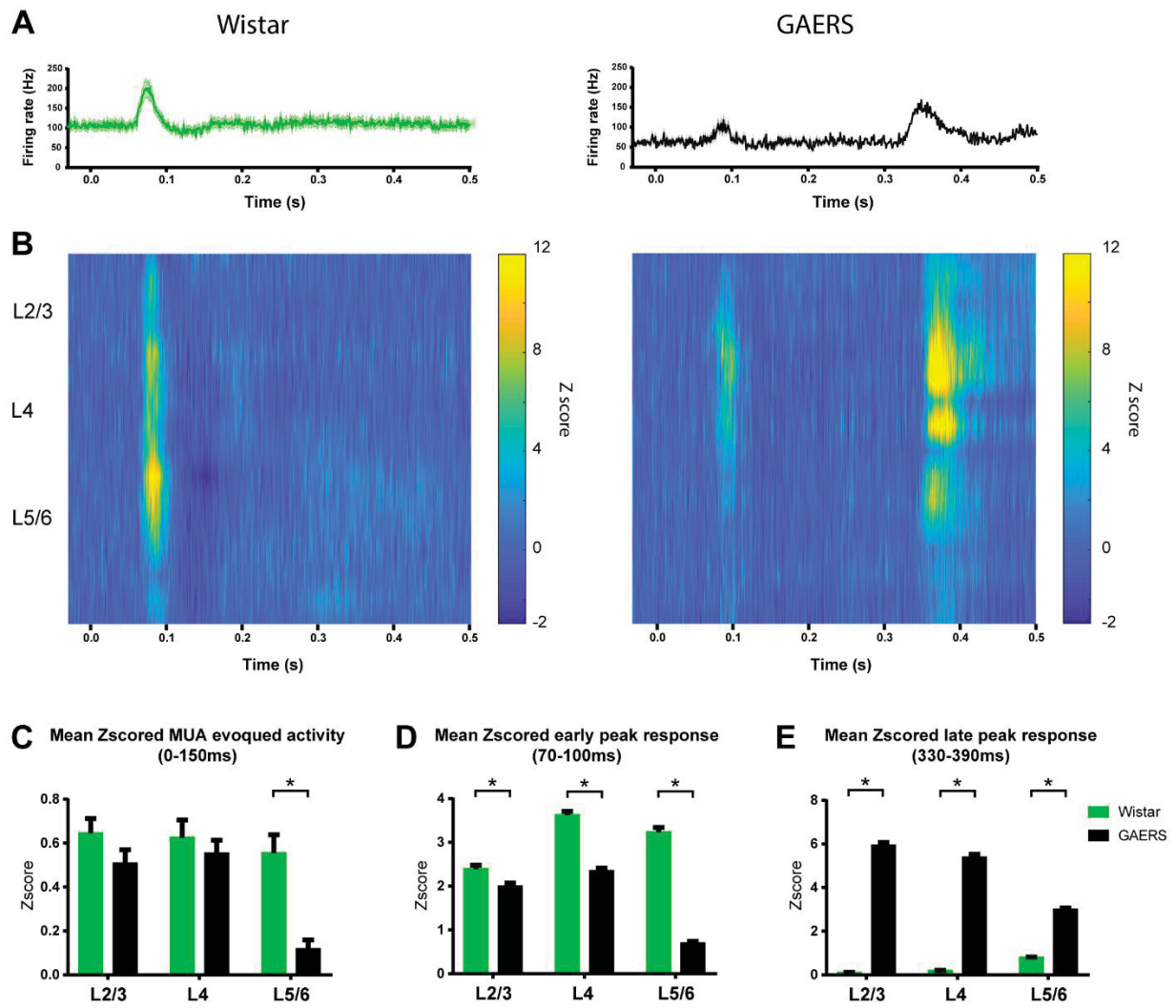


Figure 2 : Sensory evoked MUA activity in the S1Bf.

(A) Grand average PSTH among cortical layers (mean+SEM) (N=4 in Wistar and GAERS).

(B) Z scored PSTH of MUA activity with respect of cortical layers for Wistar (N=4, left) and GAERS (N=4, right).

(C) Induced MUA activity between 0-150 ms (mean+SEM). (N=4 for Wistar and GAERS; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(D) Induced MUA activity between 70-100 ms (mean+SEM). (N=4 for Wistar and GAERS; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

(E) Induced MUA activity between 330-390 ms (mean+SEM). (N=4 for Wistar and GAERS; * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney test).

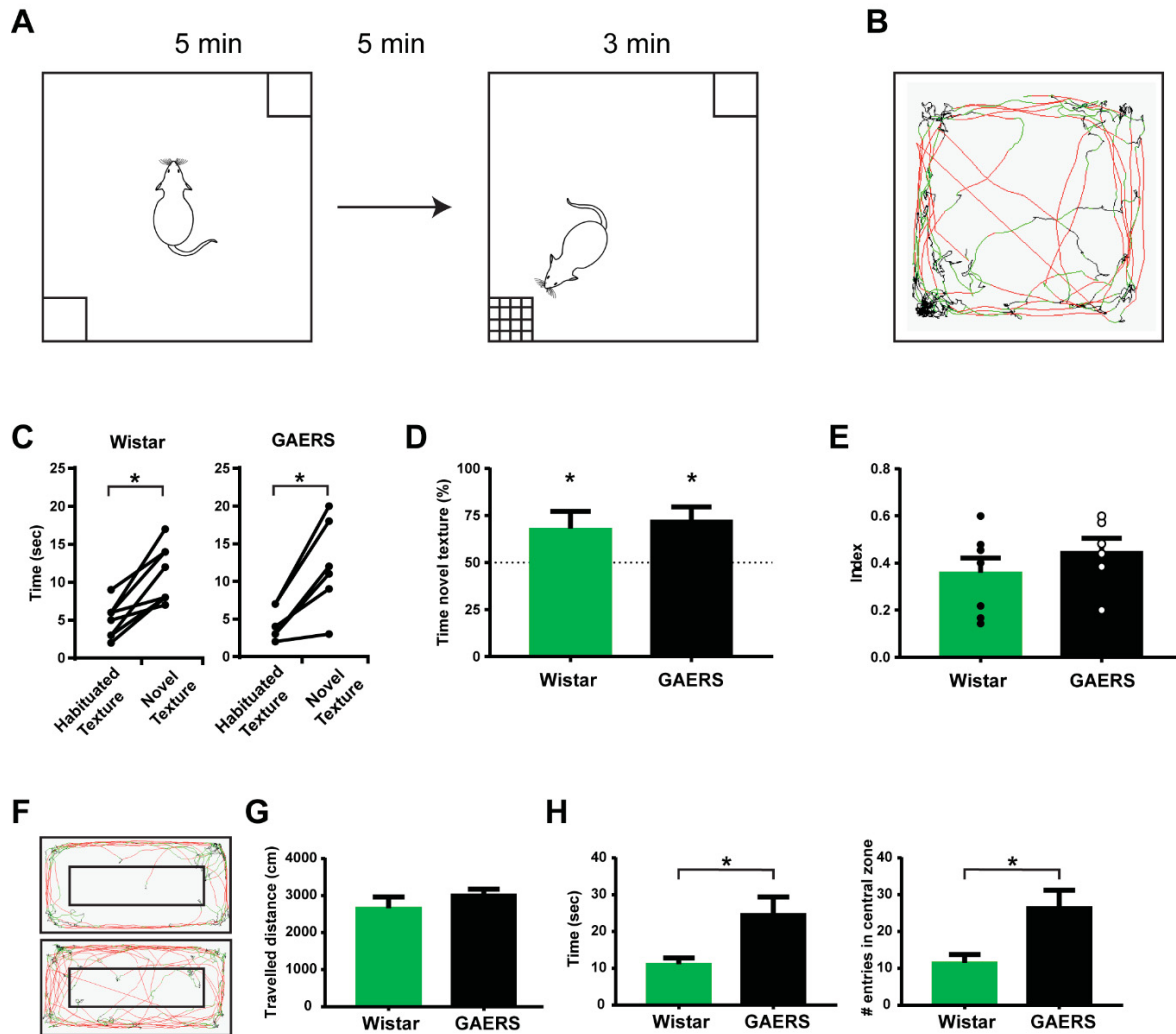


Figure 3 : Sensory discrimination, locomotion and anxiety evaluation in GAERS

(A) Schematic representation of experimental design for the discrimination task.

(B) Example trace of movement of a GAERS during the test phase (red: fast movements; green: slow movements; black: immobility). In this example the novel texture was in the bottom left corner.

(C) Time of exploration of both textures during test phase (mean+SEM; N=6 and 9 for GAERS and Wistar respectively; each paired dot represents one rat; * p<0.05, Mann-Whitney test).

(D) Percentage of time spent exploring the novel texture. Dashed line represents 50% chance level. (mean+SEM; N=6 and 9 for GAERS and Wistar respectively; * p<0.05, Wilcoxon Signed Rank test against 50% chance level).

(E) Index of discrimination (mean+SEM; n.s., Mann-Whitney test).

(F) Example trace of movement of a Wistar (top) and a GAERS (down) during the locomotion test.

(G) Total distance travelled during 10 minutes of test (mean+SEM; N=8 and 9 in GAERS and Wistar respectively; n.s., Mann-Whitney test).

(H) Time spent in central zone (left) and number of central zone entries (right) during 10 minutes of test (mean+SEM; N=8 and 9 in GAERS and Wistar respectively; * p<0.05, Mann-Whitney test).

Conclusion

L'ensemble de nos données suggèrent que, malgré les anomalies de connectivité au sein du S1BF chez le GAERS précédemment décrites (Etude 1), le cortex S1Bf est toujours capable d'intégrer les informations liées aux vibrisses. En effet, le GAERS semble capable de discriminer entre des différences fines de granulosité aussi bien que le rat contrôle Wistar. Cependant, le potentiel évoqué au niveau du S1Bf semble être retardé chez le GAERS. De plus, bien que le circuit canonique existe bien chez le GAERS, une deuxième vague d'activation est présente environ 200 ms après la première. Cela suggère que l'information sensorielle est traitée en deux fois chez le GAERS.

Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la structure et à la fonction du cortex somatosensoriel primaire du GAERS qui correspond à l'aire de génération des décharges de pointes-ondes (DPO). Ainsi, notre première étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs anomalies de connectivité structurelle au sein du S1Bf chez ces animaux. En effet, les neurones des couches profondes, qui jouent un rôle prépondérant dans l'initiation des crises, présentent une forte connectivité qui est tout particulièrement marquée à l'intérieur de leur propre couche. Ces résultats suggèrent que cette connectivité permettrait de recruter un nombre important de neurones pyramidaux lors de l'initiation de la crise, menant ainsi à la génération de DPO de grandes amplitudes. De plus, l'inhibition médiée par les interneurones GABAergiques chez le GAERS semble également modifiée. Les connexions GABAergiques sont en effet principalement locales et intralaminaires mais elles sont aussi fortes depuis les couches infragranulaires en direction des couches supragranulaires. Cela permettrait de contenir temporellement et ainsi de synchroniser l'activation des neurones excitateurs lors de la pointe épileptique. Dans un deuxième temps, nous avons pu montrer que la fonction primaire du S1Bf, le traitement des informations sensorielles qui proviennent des vibrisses, est conservée malgré ces anomalies de connectivité. Le circuit sensoriel canonique semble présent chez le GAERS bien que les réponses évoquées soient plus tardives par rapport à un rat sain.

En résumé, nos résultats suggèrent qu'il existe deux circuits corticaux de traitement et de propagation de l'information au sein du S1Bf chez le GAERS. Le premier, physiologique, qui permet le traitement de l'information sensorielle comme chez le rat non épileptique. Le second, pathologique, qui est le siège de la génération et de l'amplification des DPO pendant les crises. Sans reprendre l'intégralité des discussions proposées dans les manuscrits de la partie Résultats de cette thèse, nous proposons ici de discuter de l'hypothèse d'une hyperconnectivité au sein du circuit générateur de crises dans l'épilepsie-absence, puis de l'existence et de l'intérêt possible d'avoir deux circuits corticaux parallèles et enfin du rôle de l'inhibition GABAergique dans le contrôle de ces deux circuits.

Nous ne discuterons pas ici de l'approche méthodologique par microfaisceau synchrotron puisque cela a fait l'objet d'une revue publiée dans *Physica Medica* et qui est présentée en Annexe 1.

Epilepsie-absence : une question d'hyperconnectivité ?

La génération d'une crise d'épilepsie est communément perçue comme le signe de l'hyperexcitabilité et de l'hypersynchronisation d'un groupe de neurones (Uhlhaas and Singer, 2006). Cette synchronisation neuronale peut être liée à une forte connectivité des neurones au niveau de la zone d'initiation de la crise. Dans le cas de l'épilepsie-absence, il a été proposé que la propagation de l'activité paroxystique à l'ensemble du cortex, de façon rapide bilatérale et synchrone, serait sous-tendue par une connectivité neuronale extrêmement développée et efficace (Yan and Li, 2013).

Nos résultats obtenus chez le GAERS par traçage rétrograde monosynaptique confirment cette hypothèse d'hyperconnectivité pathologique puisque les neurones du S1Bf présentent un nombre plus important d'afférences par rapport aux rats contrôles (Wistar). En accord avec cela, lorsque cette hyperconnectivité est perturbée ou lésée par les microfaisceaux synchrotron, on observe une diminution de la puissance des DPO que l'on explique par un nombre plus restreint de neurones qui sont recrutés pendant la décharge. Une autre étude a par ailleurs suggéré qu'en déconnectant les neurones au sein d'un hémisphère chez le GAERS, on peut diminuer la cohérence et donc la communication entre les structures corticales (cortex S1 et Mo) (Pouyatos et al., 2016). Cependant, l'hyperconnectivité observée n'est pas présente de manière globale au sein du S1Bf mais dans un rayon restreint dans l'axe antéropostérieur. Ainsi, si l'activité paroxystique met en jeu cette hyperconnectivité pour se propager et s'amplifier, et étant donné que son étendue est restreinte, alors nos données suggèrent une propagation de proche en proche de l'activité paroxystique et non pas une synchronisation pathologique globale de la structure génératrice.

Pendant les crises d'épilepsie-absence, la synchronisation bilatérale est rapide (3m/sec) (Meeren et al., 2002), en accord avec le caractère « généralisé » de l'EA (bilatéral et synchrone). A la suite de callosotomies, les deux hémisphères sont désynchronisés lors des crises chez l'animal comme chez l'Homme et les DPO surviennent de façon indépendante

(Vergnes et al., 1989; Kasasbeh et al., 2014). De plus, une connectivité fonctionnelle interhémisphérique importante a été montrée chez l'Homme comme chez l'animal par IRM fonctionnelle, même en période inter-critique, ce qui renforce l'hypothèse d'une hyperconnectivité fonctionnelle entre les hémisphères (Bai et al., 2011; Mishra et al., 2013). Néanmoins, nous n'avons retrouvé qu'une très faible connectivité structurelle interhémisphérique par la méthode de traçage par RABV chez le GAERS à partir du S1Bf. Par ailleurs, une étude d'imagerie (DTI) chez l'animal adulte a suggéré qu'il y avait une diminution de la connectivité structurelle inter-hémisphérique passant par le corps calleux chez le GAERS et le WAG/Rij et que cette réorganisation pouvait être directement liée à la répétition des crises (Chahboune et al., 2009). Ces données suggèrent que la forte synchronisation interhémisphérique présente pendant les crises d'absences ne peut pas s'expliquer par une hyperconnectivité structurelle.

Ainsi, alors que l'hyperconnectivité intrahémisphérique favorise la génération et la propagation de proche en proche de l'activité paroxystique au sein du S1Bf et en direction des autres aires corticales, le recrutement de l'hémisphère controlatéral semble être possible grâce à une connectivité structurelle normale. De manière générale, la connectivité interhémisphérique du cortex S1Bf est faible et restreinte aux neurones des colonnes les plus latérales (Petreanu et al., 2007). On peut donc émettre l'hypothèse que chez le GAERS l'activité paroxystique n'envahit pas l'hémisphère controlatéral mais y arrive de manière discrète mais efficace. Cette efficacité pourrait s'expliquer par un renforcement de la connexion synaptique liée à la forte activité ou encore à la temporalité du transfert synaptique (Kampa et al., 2007) ce qui potentialiserait l'influx paroxystique dans les neurones controlatéraux, en couche L5, qui de par leur hyperexcitabilité et leur connectivité sont capables de recruter à leur tour les neurones nécessaires à la génération des DPO au sein de leur propre hémisphère. De plus, l'augmentation de l'activité des neurones pyramidaux controlatéraux en L5, par la volée excitatrice provenant de l'hémisphère opposée, permettrait le recrutement rapide du thalamus controlatéral et ainsi pourrait faciliter la généralisation des DPO (Destexhe et al., 1999).

En conclusion, l'hypothèse d'une hyperconnectivité des neurones qui favorise la génération et l'amplification des DPO semble être confirmée par nos données en ce qui

concerne le réseau intrahémisphérique (voir Article 1), sans toutefois que cette hypothèse ne permette d'expliquer la propagation rapide et la synchronisation avec le cortex controlatéral.

Coexistence d'un circuit physiologique et d'un circuit pathologique ?

Dans notre étude, nous avons confirmé que, chez le GAERS, il existe un circuit de génération et de propagation des DPO entre les couches corticales, au niveau du cortex somatosensoriel S1Bf (voir Article 1), comme cela a été proposé par Pollack et al. en 2007, et que ce circuit diffère de celui de la propagation de l'influx sensoriel classique ou voie canonique (voir Article 2) (Douglas et al., 1989; Lübke and Feldmeyer, 2007).

1. Rôles respectifs des deux circuits

L'information sensorielle provenant des vibrisses arrive par les afférences thalamiques en couche 4 du S1Bf puis se propage en L2/3 où l'information est traitée et intégrée en termes d'amplitude, de direction ou encore de vitesse (Petersen et al., 2003a; Bureau et al., 2004; Shepherd and Svoboda, 2005; Shepherd et al., 2005; Kremer et al., 2011; Reyes-Puerta et al., 2015; van der Bourg et al., 2016; Estebanez et al., 2016). Ensuite, cette information est transmise en L5 où les neurones pyramidaux propagent l'information aux autres colonnes corticales par l'intermédiaire de connexions dites « horizontales » qui permettent ainsi la détection de redondance et la sélection d'information (Adesnik and Scanziani, 2010; Boucsein, 2011; Schnepel et al., 2015). L'information est parallèlement reçue par les neurones de L6 qui la propagent en retour au thalamus. Dans le cas des DPO, nos résultats montrent que l'activité générée en L5 se propage aux neurones pyramidaux de L2/3 puis en L4 ainsi qu'aux interneurons inhibiteurs, en accord avec les résultats d'études précédentes (Polack et al., 2007; Chipaux et al., 2011; Depaulis and Charpier, 2017). Parallèlement à cette propagation intra-S1Bf, l'activité est envoyée aux autres aires corticales ainsi qu'au thalamus qui, par des

boucles de rétrocontrôle inhibiteur entre les noyaux relais du thalamus et les neurones GABAergiques du noyau réticulaire, participent de manière active à l'amplification et la structuration des DPO (Depaulis and Charpier, 2017). Le recrutement des neurones des noyaux relais du thalamus semble notamment impliqué dans la détermination de la fréquence interne des DPO. En effet, plusieurs études sur des modèles mathématiques ou réalisée *in vivo* ont émis l'hypothèse que l'inhibition lente médiée par les récepteurs métabotropiques GABA_B chez l'Homme serait responsable de la fréquence interne à 3 Hz des DPO alors que chez le rat, la fréquence de 5 à 10 Hz des DPO pourrait être expliquée par un recrutement plus important de la conductance inhibitrice rapide par les récepteurs ionotropiques GABA_A (Destexhe, 1998, 1999; Charpier et al., 1999; Bessaïh et al., 2006; Cope et al., 2009; Crunelli et al., 2011; Chipaux et al., 2011).

Nos données, ainsi que celles obtenues lors d'une précédente étude (Polack et al., 2007), suggèrent l'existence de circuits parallèles au sein du S1Bf chez le GAERS, qui mettent en jeu les mêmes acteurs mais avec des rôles différents. Dans le circuit physiologique, le transfert d'information suit une voie qui est cohérente avec les données de connectivité fonctionnelle et structurelle car la probabilité de projection des neurones de L4 est majoritaire en L2/3, de même que les neurones des couches supragranulaires se projettent principalement sur les neurones des couches L5/6 (Lefort et al., 2009; DeNardo et al., 2015). Ainsi, l'information suit le chemin le plus logique du point de vue de la connectivité, qui se met en place pendant la maturation corticale et qui est dépendante de l'influx sensoriel (Bureau et al., 2004; van der Bourg et al., 2016). Dans le circuit pathologique, l'activité paroxystique ne suit pas le gradient de probabilité de connexions structurelles ou fonctionnelles. Par exemple, les connexions entre les couches infra- et supragranulaires, bien qu'existantes, restent faibles (Shepherd et al., 2005; Lefort et al., 2009; Brill and Huguenard, 2009; DeNardo et al., 2015) alors que l'activité paroxystique semble emprunter ce chemin chez le rat adulte (Article 1) (Polack et al., 2007). Inversement, il peut y avoir un renforcement synaptique de ces connexions existantes, non pas en termes de nombre, mais en termes d'efficacité de transmission. Ainsi, là aussi, le circuit pathologique peut se construire de façon dépendante (i)

de sa propre activité, en renforçant des connexions existantes mais peu utilisées de manière physiologique et (ii) du circuit de traitement de l'information sensorielle en évitant d'utiliser les mêmes connexions. Ces deux points suggèrent que la mise en place et la maturation du réseau physiologique se ferait en amont de celui du réseau pathologique ce qui est cohérent avec les données récentes sur l'épileptogenèse du GAERS (Jarre et al., 2017, voir Annexe 2).

On peut enfin émettre l'hypothèse d'une dépendance ou tout du moins d'une influence d'un circuit sur l'autre. Par analogie aux *up and down states* décrits succinctement en introduction, le potentiel de membrane des neurones lors de la crise oscillent entre une phase dépolarisée pendant la pointe et une phase hyperpolarisée pendant l'onde (Williams et al., 2016). Or les *up and down states*, comme les DPO, peuvent être initiés par les neurones pyramidaux des couches infragranulaires (Beltramo et al., 2013). Cependant, les neurones des couches profondes chez le GAERS répondent par une décharge de potentiels d'action plus importante lorsqu'ils sont stimulés électriquement pendant la pointe que lorsque la stimulation est appliquée pendant l'onde (Williams et al., 2016). Ceci est à l'inverse des résultats obtenus par la stimulation des vibrisses chez l'animal non épileptique (Petersen et al., 2003a). Afin d'évaluer l'interdépendance entre les deux circuits, il serait nécessaire de savoir si une stimulation des vibrisses pendant la pointe entraîne également une augmentation de la décharge des neurones ou si le circuit physiologique prend le dessus sur le pathologique et induit une réduction de la réponse évoquée. Cette étude est actuellement en cours au sein du laboratoire de Stéphane Charpier à Paris.

2. Les neurones des couches 5/6 du GAERS: concilier physiologie et pathologie ?

Lors de la génération des crises chez le GAERS, les neurones des couches infragranulaires (L5/6) sont les premiers à décharger ce qui suggère qu'ils initient la DPO (Polack et al., 2007). Ceci est en accord avec nos enregistrements LFP et l'analyse puit-source réalisées pendant ce travail (Article 1). La caractérisation électrophysiologique de ces neurones chez le rat adulte a montré qu'ils sont hyperexcitables, qu'ils présentent un potentiel de membrane dépolarisé, une fréquence de décharge plus élevée et une plus grande capacité à décharger en bouffée de potentiels d'actions par rapport aux neurones des rats contrôles (Polack et al., 2007, 2009a; Chipaux et al., 2011; Pouyatos et al., 2013; Williams et al., 2016). Ces propriétés dites « ictogéniques » pourrait favoriser la génération et la propagation des DPO (Depaulis and Charpier, 2017). Paradoxalement, ces propriétés ne sont pas retrouvées chez le jeune rat lors des premiers stades de l'épileptogénèse (Jarre et al., 2017b). Cela suggère que ces propriétés ne sont pas seulement le fait d'un programme intrinsèque ou génétique au niveau de ces neurones mais qu'elles découlent également de la mise en place progressive d'un circuit pathologique capable de se renforcer du fait de la répétition d'une activité critique (Ben-Ari and Holmes, 2006).

Malgré leurs propriétés hyperexcitables et hypersynchrones, les neurones pyramidaux de L5 chez le GAERS sont toujours capables de jouer leur rôle lors du traitement de l'information sensorielle (Chipaux et al., 2013). Plus généralement, le S1Bf du GAERS semble toujours capable d'intégrer l'information sensorielle, *via* le circuit canonique (Article 2), comme le montre l'amplitude et la latence des potentiels évoqués (Chipaux et al., 2013). On aurait notamment pu s'attendre à une diminution de la réponse évoquée puisque, chez le GAERS comme chez l'Homme, les DPO sont associées à une altération de la conscience (Loiseau et al., 1995; Blumenfeld, 2012; Garzon et al., 2016; Depaulis and Charpier, 2017). Cependant, la conscience et *a fortiori* son altération sont difficile à évaluer chez l'animal (Blumenfeld, 2012) puisqu'elle est définie comme un phénomène centré sur soi qui implique de pouvoir la rapporter (Dehaene et al., 2014). Néanmoins, le système de la conscience implique des structures cérébrales associatives corticales et sous-corticales (Blumenfeld,

2012). Une des hypothèses est que la conscience reflète le lien fonctionnel qui se crée lors d'un processus cérébral entre ce système et l'effecteur du traitement de l'information (ici cognitif ou sensoriel) et qui implique un état attentionnel élevé (Dehaene and Naccache, 2001). Ainsi, pendant une crise d'absence, un signal provenant de la périphérie peut toujours être traité et induire une activation neuronale et un potentiel évoqué local (=perception, système *bottom-up*) aussi bien chez le GAERS que chez le patient (Chipaux et al., 2013; Williams et al., 2016). Selon cette hypothèse, l'intégration de ce signal (système *top-down*) ne pourrait pas se faire car il nécessite une stabilité du système que seul permet un état attentionnel particulier (Dehaene and Naccache, 2001; Schurger et al., 2015). Nos données ne nous permettent cependant pas de comprendre pourquoi cet état attentionnel n'est pas possible pendant la survenue d'une DPO.

La stabilité des potentiels sensoriels évoqués souligne donc le fait que l'activité épileptique ne perturbe pas l'activité physiologique du circuit et renforce l'hypothèse de l'existence de deux circuits de traitement parallèles dans le S1BF chez le GAERS (voir ci-dessus). La raison pour laquelle l'intégration de l'information sensorielle reste efficace pourrait être liée au fait que seuls les neurones des couches profondes présentent des caractéristiques pathologiques (Polack et al., 2007). En effet, l'information sensorielle étant en grande partie traitée en L2/3 (Adesnik and Scanziani, 2010; Crochet et al., 2011; Jouhanneau et al., 2014; Estebanez et al., 2016), un problème d'intégration sensorielle pourrait exister si ces neurones étaient les neurones ictogènes. De plus, les neurones des couches infragranulaires jouent un rôle important dans le transfert de l'information sensorielle à l'ensemble du cortex S1 et au thalamus qui, en retour, peut potentialiser la réponse du cortex aux nouvelles stimulations (Destexhe et al., 1999). On peut donc imaginer que si ces neurones des couches profondes ont une hyper-réactivité intrinsèque, ils devraient faciliter et favoriser la propagation de l'information sensorielle. Cela peut avoir deux conséquences : (i) une plus grande rapidité/efficacité de réponse notamment par la potentialisation des rétrocontrôles effectués par le thalamus et/ou par le cortex moteur mais aussi (ii) une augmentation du bruit de fond par manque de filtrage et par réactivité à des stimuli normalement infraliminaire ce qui pourrait conduire à une plus grande latence de réponse. Nos données sont cohérentes avec ces deux hypothèses. D'une part, nous observons

une tendance au retard des potentiels évoqués et une activation neuronale plus faible lors de la première vague de MUA chez le GAERS en comparaison au Wistar ce qui suggère une plus faible réactivité aux stimuli (Article 2). D'autre part, nos données montrent également une plus forte activation neuronale lors de la seconde vague de MUA initiée par les neurones des couches profondes et qui pourrait être considéré comme un phénomène de réverbération (Crochet and Petersen, 2015) (Article 2). Or, une étude récente montre que la réverbération peut être liée à un retour d'information du cortex moteur au S1 (Manita et al., 2015). On peut donc émettre l'hypothèse que, si la seconde activation est plus importante que la première, cela peut être dû à l'activation des neurones des couches profondes qui sont hyperexcitables chez le GAERS.

Ainsi, les neurones des couches infragranulaires interviendraient à la fois dans l'initiation des DPO et dans le traitement de l'information sensorielle et aucune étude à ce jour n'a pu mettre en évidence une dichotomie neuro-anatomique où ces deux fonctions seraient portées par deux classes distinctes de neurones pyramidaux. On sait néanmoins que les neurones ictogènes ont la capacité de décharger en bouffées de potentiels d'action (Williams et al., 2016) et de propager l'activité paroxystique rapidement chez le GAERS (Polack et al., 2007, 2009a). Or, au sein du S1Bf, il existe deux sortes de neurones pyramidaux notamment dans la couche 5 (voir Introduction § 1.2.1): (i) les *slender tufted* qui ont une activité régulière et une projection axonale limitée à la colonne corticale et (ii) les *thick tufted* qui déchargent en bouffées et ont une projection axonale transcolonnaire favorisant la propagation horizontale (Jacob et al, 2012; Staiger et al., 2016). Au vu de leur projection transcolonnaire et de leur décharge en bouffé, cette deuxième classe de neurones pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'initiation et la propagation des DPO. Cependant, à ce jour, aucun argument ne permet de confirmer l'hypothèse que les neurones pyramidaux ictogènes chez le GAERS constituent une sous-population au sein des L5/6 (Depaulis et Charpier, 2017).

La principale inconnue est de comprendre comment et pourquoi les neurones des couches 5/6 vont, à un instant donné, se synchroniser pour initier la DPO. En d'autres termes, la question qui reste en suspens est quel est l'élément ou l'évènement déclencheur de la synchronisation pathologique et comment il se met en place au cours de la maturation corticale.

En résumé, l'existence de deux circuits au sein du S1Bf chez les GAERS permet le traitement en parallèle de deux types d'activité. Le circuit épileptique pourrait néanmoins se construire après le circuit physiologique en renforçant des connexions neuronales peu impliquées dans le traitement sensoriel. Il n'est cependant pas exclu que ces deux circuits impliquent des groupes/populations de neurones différents notamment lors de l'initiation des DPO dans les couches infragranulaires. On peut ainsi émettre l'hypothèse de la spécialisation d'une sous-population de neurones dans un des circuits si un degré de liberté suffisant lui est laissé par l'autre circuit. Une autre possibilité serait que cette spécialisation soit liée à un programme génétique différent entre les deux classes de neurones pyramidaux des couches infragranulaires puisque l'on sait que le devenir des neurones corticaux dépend de l'environnement de ces neurones mais qu'il est également contrôlé par des programmes génétiques intrinsèques (Rakic et al., 2009; Costa and Müller, 2015).

Le système inhibiteur comme potentialisateur de l'activité épileptique ?

Les interneurones GABAergiques au sein des cortex sensoriels permettent de favoriser la sélectivité des neurones à un stimulus donné (Katzner et al., 2011; Petersen et al., 2003b). Pour cela, ils exercent sur les neurones excitateurs des contraintes à la fois temporelles et spatiales. La contrainte temporelle permet de déterminer une période permissive à la décharge des neurones (Isaacson and Scanziani, 2011). Cette modulation inhibitrice passe notamment par des circuits de *feed forward inhibition*. Il a été démontré dans le cortex somatosensoriel primaire que lors de la stimulation de la vibrisse spécifique, les cellules pyramidales sont activées avant les interneurones, alors que lors d'une stimulation non spécifique le délai entre l'activation excitatrice et inhibitrice est réduit ce qui empêche la réponse sélective des cellules excitatrices à la stimulation (Wilent and Contreras, 2005). Ce délai temporel permettrait la sélection de l'information sensorielle et participerait ainsi à son intégration. La contrainte spatiale permet de limiter l'étendue ou la propagation de la réponse

à une stimulation et ainsi participe à la formation des champs récepteurs. Ainsi, il a été démontré que dans le S1Bf, lors de la levée d'inhibition par application d'un antagoniste GABAergique, l'information sensorielle se propage de manière plus large au sein du cortex et n'est plus contenue dans la colonne spécifique à la vibrisse stimulée (Petersen et al., 2003b).

Ainsi, en contraignant l'activation des neurones excitateurs qui sont les détecteurs d'information sensorielle et de coïncidence (Rudolph and Destexhe, 2003; Boucsein, 2011), mais également les effecteurs de l'intégration de cette information, les interneurones modulent de façon active l'information reçue et dessinent la réponse évoquée par l'influx sensoriel au niveau cortical.

Grâce au traçage par RABV et à l'identification des neurones présynaptiques exprimant le GABA (environ 10% des neurones présynaptiques détectés), nos données structurales nous ont permis de mettre en évidence une connectivité inhibitrice plus importante au sein du S1Bf chez les GAERS que chez les Wistar. De plus, après microtransections corticales par microfaisceaux synchrotron chez le GAERS, nous avons observé une diminution globale de l'inhibition au sein du S1Bf et tout particulièrement des connexions inhibitrices entre les couches 5/6 et les couches 2/3. Cette diminution structurelle est accompagnée d'une diminution de la pente positive de la pointe épileptique, période d'inhibition active chez le GAERS intact (Chipaux et al., 2011; Depaulis and Charpier, 2017), ainsi que d'une augmentation de la fréquence de décharge des neurones en L4 aussi bien pendant la crise qu'en période inter-critique. Ces deux événements peuvent s'expliquer par une diminution de l'inhibition GABAergique. Une diminution de l'inhibition pourrait se traduire, pendant la pointe, par un retard dans l'arrêt d'activation des neurones excitateurs qui pourrait se traduire par une pente de pointe épileptique plus faible, en accord avec nos résultats. Cette hypothèse souligne l'intérêt du rôle actif que joueraient les interneurones dans la construction de la pointe (Chipaux et al., 2011; Depaulis and Charpier, 2017).

Nos résultats après microtransection montrent une diminution de la puissance et de l'amplitude des DPO ainsi qu'une augmentation de la variabilité de temporalité de la décharge des neurones pendant la pointe épileptique. Ces données pourraient être expliquées, au moins en partie, par une diminution de la contrainte temporelle exercée par les interneurones GABAergiques sur les cellules excitatrices. Cette diminution de la contrainte temporelle pourrait réduire le nombre de neurones qui se synchronisent à un instant T et se traduire par

une activation des neurones excitateurs sur une période plus longue pendant la pointe épileptique. Ceci est en accord avec la diminution de puissance de la DPO observée dans notre étude. Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs GABA_A sont impliqués dans la sélectivité de décharge des neurones liée à un stimulus sensoriel (Katzner et al., 2011). D'autre part, il a été suggéré que chez le GAERS l'inhibition médiée par les récepteurs GABA_A renforce la synchronisation des neurones ictogènes (Chipaux et al., 2011). Ceci suggère que la transmission inhibitrice ionotropique au sein du cortex S1Bf du GAERS pourrait être exacerbée, allant ainsi dans le sens d'une contrainte temporelle pathologique favorisant la synchronisation des neurones pyramidaux. Cette contrainte temporelle pourrait contraindre les neurones à décharger dans une fenêtre de temps précise, i.e. la pointe épileptique, jouant ainsi un rôle majeur dans la synchronisation neuronale.

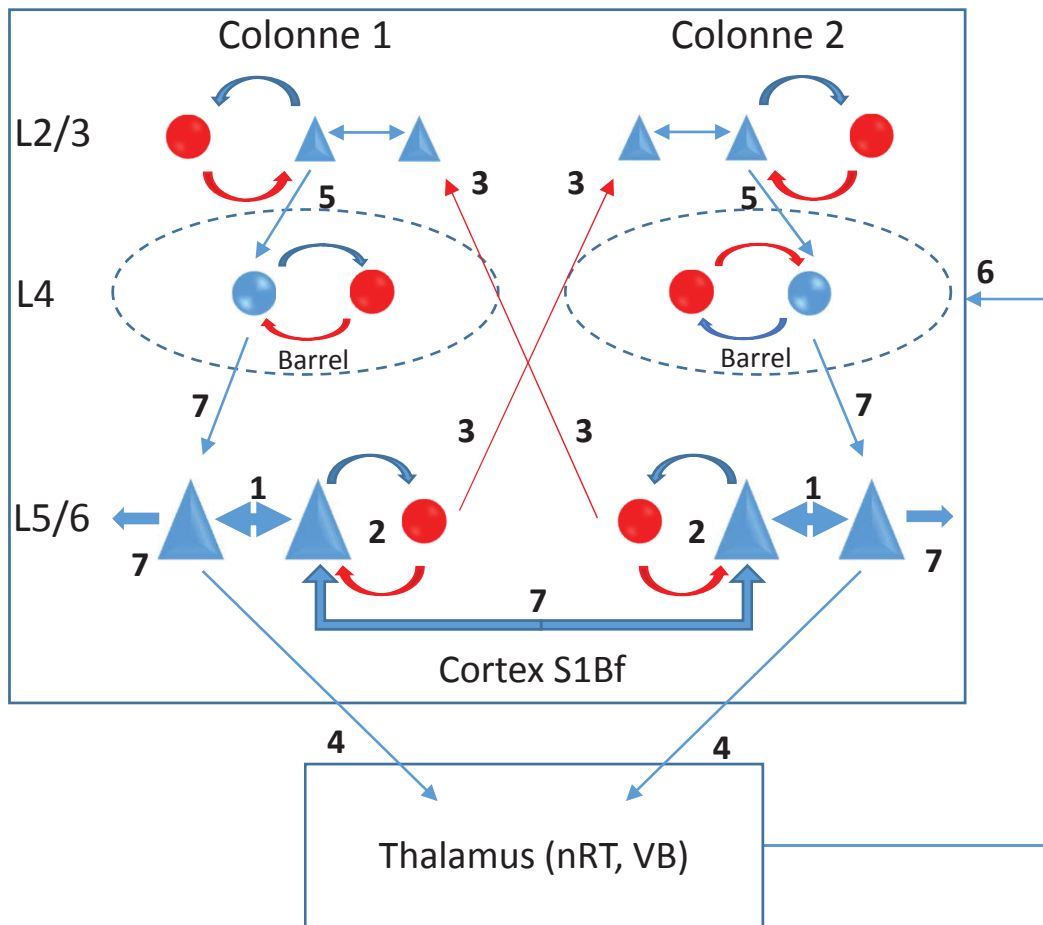
Ce rôle synchronisateur de l'inhibition pourrait également expliquer le transfert de l'activité paroxystique des L5/6 vers les L2/3 observée par analyse de puits-source et suggérée dans de précédentes études (Castro-Alamancos, 2000; Castro-Alamancos and Rigas, 2002). En effet, la connexion GABAergique L5/6→L2/3 peut permettre la synchronisation de l'activité des neurones des couches supragranulaires avec celle des neurones des couches infragranulaires par l'intermédiaire d'un circuit de type *feed-forward inhibition* (Silberberg and Markram, 2007). Selon cette hypothèse, l'activité synchrone des neurones en couche profonde, qui initie la DPO, induirait une activation des interneurons GABAergiques de cette même couche (Chipaux et al., 2011). A leur tour, ces interneurons localement activés inhiberaient les neurones des couches 2/3. La répétition rythmique de cette inhibition translaminaire synchroniserait progressivement les neurones excitateurs des couches supragranulaires permettant ainsi le transfert de l'activité paroxystique hypersynchrone des couches profondes vers les couches plus superficielles. Ces données vont dans le sens d'un rôle essentiel des connexions inhibitrices, locales et translaminaires, dans l'hypersynchronisation pathologique qui permet la génération et la propagation de l'activité paroxystique au sein du S1Bf chez le GAERS.

Globalement, nos données suggèrent que le site d'initiation des crises chez le GAERS, i.e. le S1BF, est doté d'une connectivité inhibitrice très développée qui favorise la synchronisation pathologique des neurones excitateurs permettant ainsi de former, d'amplifier et de propager les DPO.

Nous proposons le scénario suivant quant à l'identité des neurones inhibiteurs impliqués. La connexion inhibitrice entre les couches L5/6 et L2/3 qui est affectée par les microtransections ne semble pas être intracolonnaire. En effet, les microtransections étant parallèles à l'axe des colonnes, les connexions les plus touchées semblent être les projections horizontales ou transcolonnaires. L'hypothèse la plus probable est que ces neurones inhibiteurs soient des cellules de Martinotti car seule cette classe d'interneurones des couches profondes émet des projections de manière transcolonnaire vers les neurones des couches 2/3 des colonnes adjacentes (Feldmeyer et al., 2017) (Figure 8). Selon ce raisonnement, leur blocage devrait diminuer la synchronisation des neurones ictogènes et réduire la propagation de l'activité paroxystique en L2/3. L'inhibition spécifique de ces interneurones, par DREADD ou optogénétique, pourrait nous permettre de tester cette hypothèse.

Proposition d'un schéma intégré de l'initiation et de la propagation des DPO chez le GAERS

Lors de cette thèse, nous avons mis en évidence des différences, structurelles et fonctionnelles, des réseaux neuronaux au sein du S1Bf entre le GAERS et le Wistar qui pourraient expliquer l'initiation et la propagation des DPO dans cette région du cortex. Nous proposons ici un circuit pathologique qui serait le berceau de l'activité paroxystique (Figure 20). Ce circuit se base sur ceux précédemment proposés (Polack et al., 2007; Depaulis and Charpier, 2017) auxquelles nous avons intégré nos nouvelles données et hypothèses, notamment en ce qui concerne le rôle des circuits inhibiteurs dans la synchronisation neuronale et celui des connexions horizontales dans la propagation de l'activité paroxystique. D'autre part, l'essentiel du circuit concerne la formation de la pointe épileptique. Nous savons aujourd'hui peu de choses sur l'onde sinon que les neurones corticaux sont essentiellement silencieux pendant cette phase et présentent un potentiel de membrane hyperpolarisé (Williams et al., 2016). L'onde résulterait donc du silence neuronal suivant la décharge hypersynchrone des neurones corticaux.



- 1) Hyperconnectivité et hyperactivité des neurones pyramidaux des couches profondes
- 2) Hypersynchronisation des neurones pyramidaux de L5/6 par *feed back inhibition*
- 3) Entraînement des neurones pyramidaux de L2/3 par les neurones de L5/6 par *feed forward inhibition* (cellules de Martinotti ?)
- 4) Activation thalamus
- 5) Propagation L2/3→L4
- 6) Activation L4 par thalamus
- 7) Retour L5/6 et amplification/propagation latérale par connexions horizontales

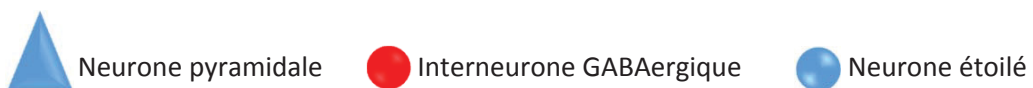


Figure 20: Schéma intégré du circuit d'initiation et de propagation des DPO chez le GAERS

Les DPO sont initiées par les neurones des couches infragranulaires du cortex S1Bf chez le GAERS en raison de leur hyperactivité (Polack et al., 2007, 2009a; Pouyatos et al., 2013; Williams et al., 2016; Jarre et al., 2017b) et de leur très forte connectivité intralaminaire (Article 1). Cette connectivité accrue, associée à des boucles locales de rétrocontrôle inhibiteur, favoriserait l'hypersynchronisation de ces neurones. Parallèlement, les interneurons GABAergiques activés par les neurones pyramidaux vont également inhiber de façon rythmique, par des boucles de *feed forward inhibition*, les neurones pyramidaux des couches 2/3 et ainsi leur imposer la synchronisation initiée par les neurones des couches infragranulaires. D'autre part, les neurones des couches infragranulaires activent les neurones du thalamus qui modulent par rétrocontrôle l'activité synchrone paroxystique qui se propage aux neurones de la couche 4. Ceci pourrait expliquer la décharge bimodale des neurones excitateurs de L4 observée lors d'enregistrements intracellulaires pendant la pointe épileptique (Polack et al., 2007). Enfin, cette activité synchrone revenant aux neurones des L5/6 pourrait diffuser de proche en proche aux colonnes corticales adjacentes et amplifier l'activité synchrone paroxystique grâce aux connexions horizontales.

Annexes

Annexe 1

Synchrotron X-ray microbeams: A promising tool for drug-resistant epilepsy treatment

F Studer, R Serduc, B Pouyatos, T Chabrol, E Bräuer-Krisch, M
Donzelli, C Nemoz, J.A. Laissue, F Estève, A Depaulis

Manuscrit soumis à *Physica Medica* le 8 janvier 2015

Révisé le 7 avril 2015

Manuscrit accepté dans *Physica Medica* le 9 avril 2015



Original paper

Synchrotron X-ray microbeams: A promising tool for drug-resistant epilepsy treatment



F. Studer ^{a, b}, R. Serduc ^{a, b}, B. Pouyatos ^d, T. Chabrol ^{a, b}, E. Bräuer-Krisch ^e, M. Donzelli ^e,
C. Nemoz ^e, J.A. Laissue ^f, F. Estève ^{a, b, c}, A. Depaulis ^{a, b, c, *}

^a Inserm, U836, F-38000 Grenoble, France

^b Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, F-38000 Grenoble, France

^c CHU de Grenoble, F-38000 Grenoble, France

^d SynapCell SAS, 38700 La Tronche, France

^e European Synchrotron Research Facility, Biomedical Beamline ID17, Grenoble, France

^f University of Bern, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2015

Received in revised form

7 April 2015

Accepted 9 April 2015

Available online 29 April 2015

Keywords:

Epilepsy

Radiosurgery

Synchrotron X-ray microbeams

Animal models

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most important neurological diseases. It concerns about 1% of the population worldwide. Despite the discovery of new molecules, one third of epileptic patients are resistant to anti-epileptic drugs and among them only a few can benefit from resective surgery. In this context, radiotherapy is an interesting alternative to the other treatments and several clinical devices exist (e.g., Gamma Knife[®]). The European Synchrotron Radiation Facility offers the possibility to develop new methods of radiosurgery and to study their antiepileptic effects. Here, we discuss several studies that we performed recently to test and try to understand the antiepileptic effects of X-ray synchrotron microbeams in different animal models of epilepsy. We showed a decrease of seizures after *Interlaced Microbeam Radiotherapy* (IntMRT) of the somatosensory cortex, known as the seizure generator, in a genetic model of absence epilepsy. These antiepileptic effects were stable over 4 months and with low tissular and functional side-effects. The irradiated pyramidal neurons still displayed their physiological activity but did not synchronize anymore. We also obtained a lasting suppression of seizures after IntMRT of the dorsal hippocampus in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. However, an important variability of antiepileptic efficiency was observed probably due to the small size of the targeted structure. Despite these encouraging proofs-of-concepts, there is now a need to adapt IntMRT to other models of epilepsy in rodents which are close to refractory forms of epilepsy in human patients and to implement this approach to non-human primates, before moving to clinical trials.

© 2015 Published by Elsevier Ltd on behalf of Associazione Italiana di Fisica Medica. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The epilepsies and the need for new therapies

Epilepsy is a devastating multi-causal chronic disease characterized by recurrent spontaneous seizures and affects about 1% of the population worldwide. This represents about 3 million people in Europe which implies an annual cost of 15.5 billion euros [1]. Although epilepsy is defined by the presence of recurrent seizures, it is often associated with comorbid abnormalities in cognition,

psychiatric status, and social-adaptive behavior, as well as with an increased risk of mortality. This is especially true in drug-resistant epilepsies, which represent a socioeconomic burden at the individual, familial, societal and political levels in all countries across the globe. Drug-resistant epilepsies account for about one third of adult epileptic patients. Among them, some may benefit from resective surgery of the epileptogenic zone. Indeed, complete seizure freedom can be obtained by neurosurgical resective surgery with a rate of success of about 42% 5 years after resection to 33% 10 years later [2]. Resective surgery is currently the gold-standard treatment capable of suppressing drug-resistant seizures [3]. But surgery requires that the epileptic zone is (i) focal, (ii) clearly identified and (iii) can be safely removed [4]. This is a rather rare combination and only a limited number of patients can indeed benefit from such a surgical approach. The development of

* Corresponding author. Grenoble - Institut des Neurosciences, Centre de recherche Inserm U 836, Université Joseph Fourier - Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, Chemin Fortuné Ferrini, 38700 La Tronche, France. Tel.: +33 04 56 52 06 65; fax: +33 04 56 52 06 69.

E-mail address: antoine.depaulis@ujf-grenoble.fr (A. Depaulis).

alternative surgical approaches for challenging brain areas could increase the number of drug-resistant patients that could be cured from their focal epilepsy. In this context, our consortium has investigated for the last 5 years the effects of synchrotron microbeam-based therapies to suppress seizures in animal models. In this chapter, we review our work and discuss the perspectives of this approach.

The use of microbeams

Radiosurgery represents one of the most promising alternative to resective surgery. Indeed, modern radiosurgical devices such as Gamma Knife® and Cyberknife® [5] have provided satisfying results in treating various types of epilepsies associated with arteriovenous malformations, cavernomas, tumors, mesio-temporal sclerosis and hypothalamic hamartomas (see Ref. [6] for review). However, the reported failures in radiosurgical treatment of epileptic foci are often correlated with the radiosensitivity of normal tissues surrounding the lesion, which sets the limit to the radiation dose that can be safely delivered within the target [7,8]. The lateral dose gradients from the irradiated target to surrounding sensitive structures which are achievable with high-energy photons (MeV range) display a broad distribution of dose (Fig. 1), thus preventing delivery of high enough and curative doses to the target without injuring functional adjacent structures. The low-energy photons (keV) generated by 3rd generation synchrotron sources offer an adequate dose rate, energy spectrum and a minimal beam divergence which allows the deposition of extremely steep lateral dose fall-off (Fig. 1) [9]. Therefore, synchrotron X-ray radiosurgery provides sufficient precision to perform experimental studies in animal models of epilepsy, which is unachievable using conventional megavoltage radio-oncologic devices used in hospitals.

The use of spatial fractionation of ionizing radiation in the microscopic range was first reported at the end of the fifties [10–13]. A 25 μm -wide deuteron microbeam failed to elicit visible cerebral damage in mice unless absorbed doses were over 3000 Gy; the deuterons, however, reached only 1.5 mm tissue depth. The recent availability of microplanar 50–150 keV synchrotron-generated x-ray beams (microbeams or MB) produces sharply defined beam edges deep in the tissues and with a high dose rate [14]. This has led to investigate the effects of MB on murine brains, using arrays of quasi parallel 25–75 μm -wide beam slices spaced 50–200 μm on center [15]. The tissue lesions resembled those induced by deuteron MB [11,12]. Surprisingly, animals withstood absorbed doses of hundreds, even thousands of gray from x-rays delivered to microscopic slices of their brains [16]. Tissue damage (i.e., cellular death) was confined to the MB paths. For example, adult cerebellum of pigs irradiated as weanling piglets showed stripes of cell loss restricted to the MB tracts [17] (Fig. 2). All irradiated pigs developed normally and never displayed any behavioral or developmental adverse effects.

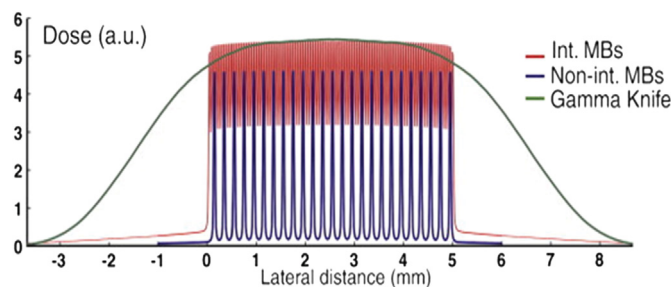


Figure 1. Lateral dose-profiles for a 5 mm-wide irradiation field produced by interlaced and non-interlaced MB and by a Leksell Perfexion® Gamma-Knife.

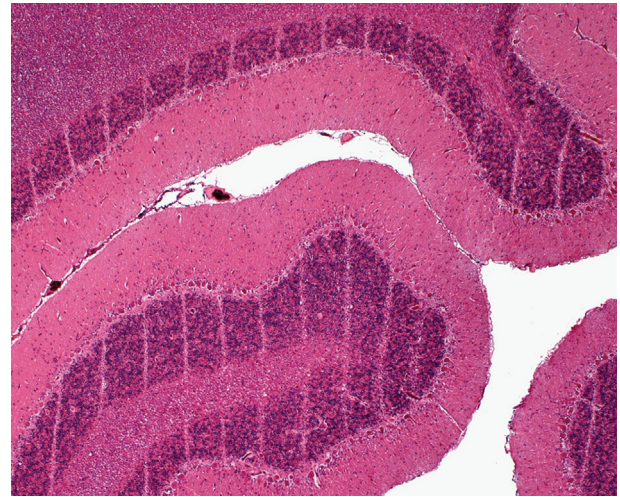


Figure 2. Histological section of pig cerebellum 15 months after MB (20–30 μm wide, 210 μm apart) irradiation performed with an entrance dose of 300 Gy (HE staining).

Recently, we introduced a novel use of MB: by rotating the brain around a center of rotation using a goniometer, we precisely interlaced MB to deposit a high homogeneous radiation dose into discrete brain regions [18], with no extensions on neighboring tissue [18] (Fig. 3). This irradiation procedure, which allows a lateral dose fall-off about 200 times greater than conventional radiotherapy [18], was called *Interlaced Microbeam Radiotherapy (IntMRT)*. The submillimetric precision of targeting, combined with the preservation of surrounding tissues, makes IntMRT clinically attractive for all pathologies that require circumscribed destruction, inactivation and/or disconnection of small brain regions, even if close to eloquent or vital structures.

First proof of concept of IntMRT in a genetic model of epilepsy in the rat

Short term functional effects

The efficiency of IntMRT is currently verified in rodent brain tumor treatment but this novel approach of high dose delivery appeared relevant for non-cancerous brain disease therapies. In 2010, we established a collaboration which aimed at evaluating IntMRT efficacy on epileptic tissue. Our working hypothesis was based on the fact that several studies in patients [19,20] and animal models [21–23] suggested that an antiepileptic effect could be obtained even if the irradiation did not result in necrosis of the targeted structure. This non-necrotizing radiotherapeutic effect was believed to be caused by biochemical alterations and neuro-modulation, although the cellular mechanisms remained elusive [20,24]. One of the prerequisites was to target an epileptic tissue with well-identified neurons generating seizures and presenting no cell loss and/or sclerosis to avoid confounding factors, thus allowing the assessment of radiation-induced changes. For these reasons, we chose to first perform IntMRT in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) [25]. The GAERS has emerged as a well-recognized and studied rat model for idiopathic generalized epilepsy with absence seizures. Many studies have characterized its behavioral, electrophysiological, pathophysiological and pharmacological features, which closely resemble human absence seizures [26,27]. GAERS display very stable spontaneous spike-and-wave discharges (SWD) on the cortical electroencephalogram (EEG) accompanied by simultaneous behavioral arrest, characteristic of absence seizures. In addition, the model allows both long term

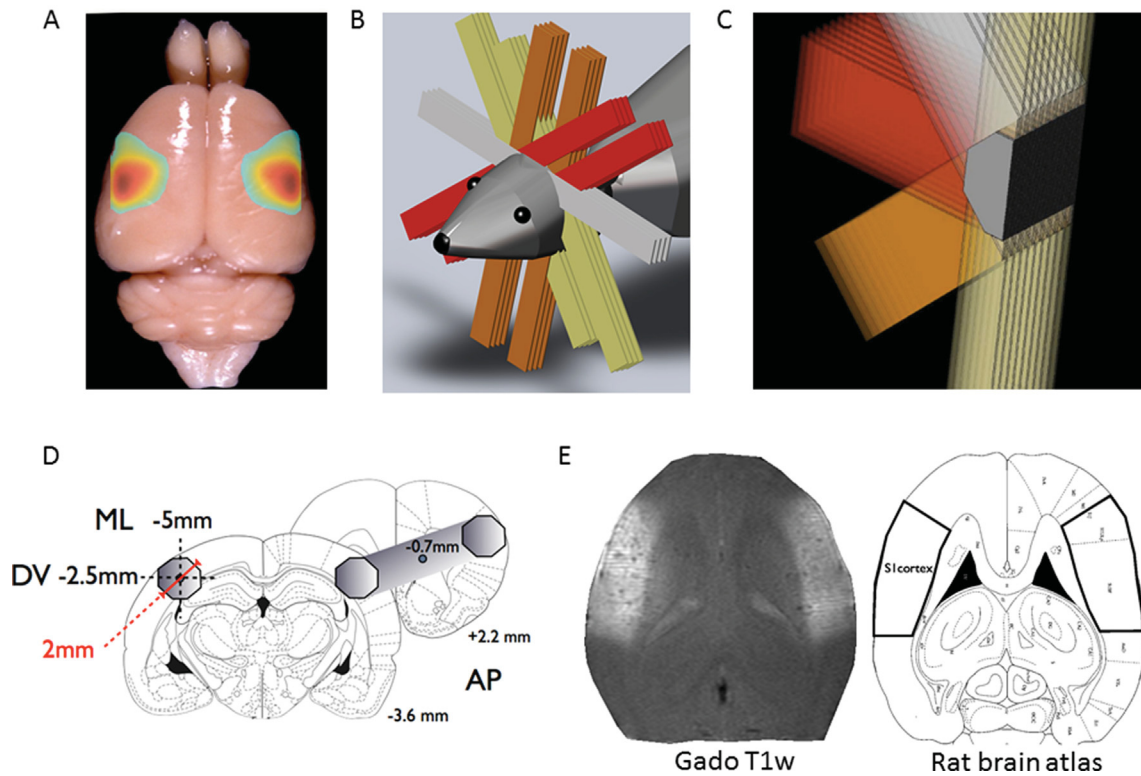


Figure 3. A. Average color-coded map of the absence seizure foci in GAERS rats ($n = 6$) obtained from subdural multielectrode recordings. Hot colors represent the location of the drivers of spike-wave discharges based on non-linear association analyses (H2). B–C. 3D representation of the microbeam interlacement. The volume receiving a homogeneous dose is depicted in grey. D. Coordinates of the irradiation targets superimposed to the corresponding rat brain stereotaxic atlas plates [30]. E. Two-week post-irradiation T1w/Gadolinium MR image showing the sharply delimited hypersignals in the bilateral somatosensory cortices, juxtaposed to the corresponding atlas plate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

seizure monitoring and access to the ictal activity of individual neurons [28].

Recently, we showed in the GAERS that the SWD are initiated in the somato-sensory cortex and then spread rapidly to the motor cortex and the ventrobasal thalamus [28,29]. We therefore targeted these three brain regions. In order to precisely irradiate the brain volume of each of these regions, we positioned anaesthetized GAERS rats on a Plexiglas stereotaxic frame mounted on micrometric motors, allowing movements and rotations in the 3 dimensions. The bregma, at the junction of the frontal and parietal bones, was clearly visualized on the x-ray reconstructed image of the rat's head and used to define the coordinates [30] of irradiation fields. Then, the beam was spatially fractionated into an array of parallel microbeams ($50 \mu\text{m}$ wide, $200 \mu\text{m}$ on-center distance) by a multislit collimator. Each side of the targeted brain regions was irradiated using 4 ports separated by a 45° angle and a $50 \mu\text{m}$ step, to generate a solid dose deposition at the interlaced region (Fig. 3). The nominal dose deposited within the target was fixed at 200 Gy (according to Monte Carlo simulations [31]). In each animal, we verified the correct targeting by T_1 -weighted magnetic resonance imaging (MRI) within the two weeks that followed IntMRT and examined their general behavior by standard tests to detect possible side effects. We also euthanized some irradiated animals for histological analysis, using Nissl stains and stains for myelin sheaths. Outside the interlaced target, the microbeam tracks were visible in the striatum and the S1 cortex (Fig. 4B) on histological brain sections obtained two months after irradiation, as thin clear stripes alternating with darker, nominally non-irradiated tissue swathes $\approx 200 \mu\text{m}$ spaced apart. Radiation effects were also confirmed on immuno-labeled slices for NeuN, GFAP, Type IV collagen, RECA and GLUT-1, respectively markers of neurons,

astrocytes, basal lamina, angiogenesis and glucose transporter. MRI controls done 2 weeks after irradiation confirmed the accuracy of radiation targeting and the minimal changes in surrounding tissues, as shown by localized increase in contrast-agent diffusion on MRI (Figs. 3E and 4A). Similarly, histopathological controls revealed minor structural tissue disruptions in the short-term post-irradiation phase (2 months) (Fig. 4B). It is important to note that although eloquent cortex was targeted bilaterally, no significant behavioral alterations were measured (Rotarod[®], open-field) in the acute (2 weeks) post-irradiation phase. Altogether these controls confirmed that IntMRT has limited short-term deleterious effects on brain tissue and does not lead to strong motor or cognitive impairments up to two months after irradiation.

During the 4 months that followed irradiation, we monitored absence seizures weekly, in freely-moving animals, by recording local-field potentials (LFP) from depth electrodes implanted in the three target regions. These recordings showed that MB irradiation suppressed SWD when the somatosensory cortex was irradiated (Fig. 3C). While non-irradiated cortical and thalamic regions could still produce epileptic discharges, the irradiated volume became isolated from the pathological activity. In contrast, MB irradiation of the motor cortex or ventrobasal thalamus did not significantly suppress SWD [25]. The mechanisms of the functional exclusion of the somatosensory cortex were further investigated by individually recording irradiated neurons two months after irradiation using *in vivo* intracellular electrophysiological recordings, as previously used [28]. This approach revealed that the irradiated pyramidal neurons were strongly hyperpolarized, displayed a decreased excitability and a reduction of spontaneous synaptic activities [25] (Fig. 4C). These functional alterations may explain the suppression of paroxysmal oscillations within irradiated cortical networks

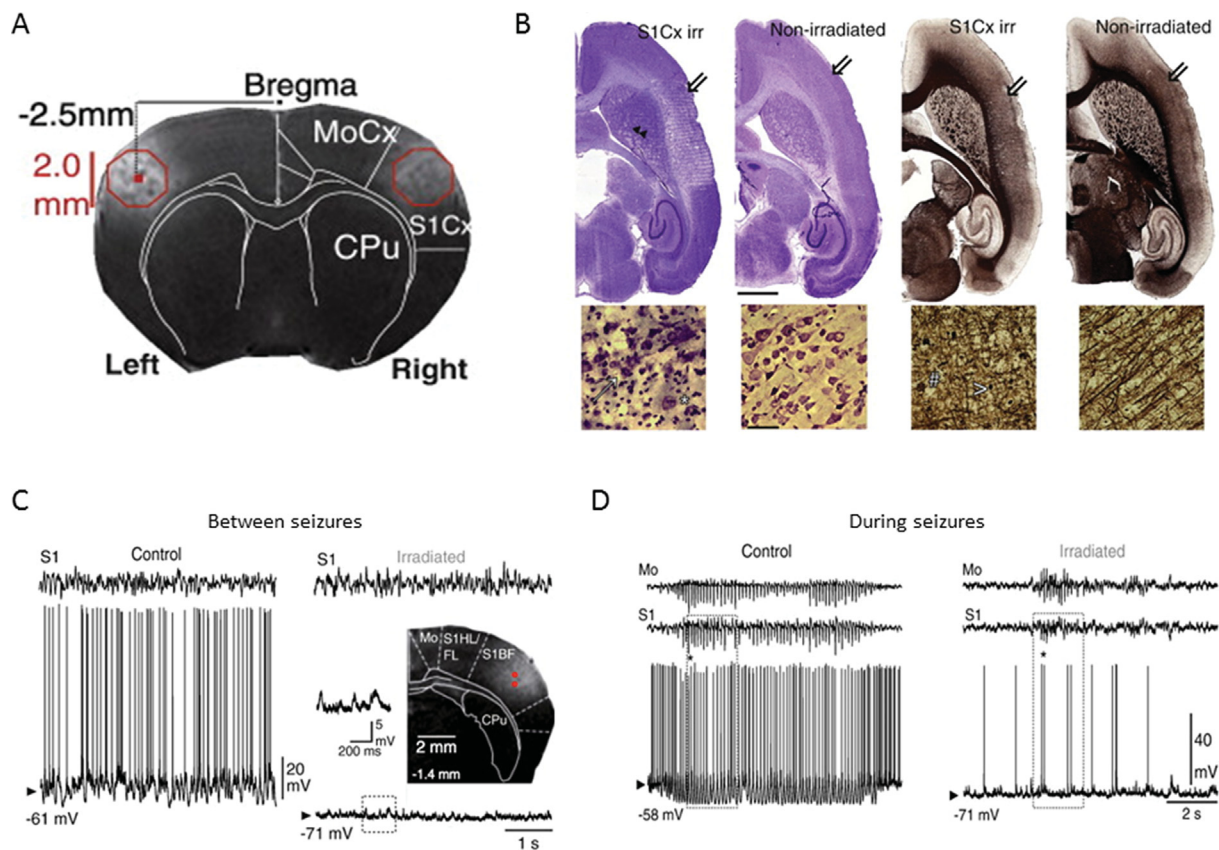


Figure 4. A. Contrast agent enhanced T1 MR image acquired 14 days after a bilateral irradiation of the somatosensory cortex. Irradiated volume geometry is delimited in red. Brain structures (Mo: Motor cortex; S1: primary somatosensory cortex; CPu: Caudate Putamen nuclei) are superimposed to the MR image. B. Nissl (two left panels) and myelin staining (two right panels) of irradiated and non-irradiated cortical tissue two months posttreatment. Electrophysiological characterization of irradiated and control neurons from the deep layers of the somatosensory cortex (red dots on MR image): interictal (C) and ictal (D) activities showing a reduction of action potential frequency and a hyperpolarization in irradiated neurons, as well as a loss of synchronized activities during seizures. From Ref. [21]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Fig. 4D). This pioneering work provides the first post-irradiation electrophysiological recordings of individual neurons. As such, these recordings are a preliminary and critical step towards understanding how ionizing radiation energy delivery impacts neuronal physiology and physiopathology. Indeed, our data should provide clues on how radiation dose should be delivered for targeting epileptic neuronal networks.

Long-term histological effects

Our experiment provided evidence of moderate histological consequences at 2 months post-irradiation. Nevertheless, long-term risks (one year or more) associated with the delivery of quasi-seamless doses into restricted brain regions should not be minimized. Indeed, the extent of normal tissue damage induced by moderate doses delivered by MB depends to a large extent on spatial fractionation. IntMRT delivers a high radiation dose almost homogeneously to a submillimetric well-delimited brain volume [18]. In a normal brain, such lesions display short-term MRI features indicative of a disruption of the blood-brain barrier [32]. Few data are yet available on long-term consequences of IntMRT in the brain. Even low doses of seamless irradiation delivered by a single broad beam elicit late vascular and parenchymal necrosis in the central nervous system of laboratory animals, mostly as a consequence of arterionecrosis [33]. Stereotactic irradiation of the frontal cerebral lobes of normal rats with 2 or 3 mm sized collimators and doses of 30–50 Gy result in radiation necrosis about 19 months after

exposure [34]. Such observations temper against premature assessments of damage to the central nervous system by homogeneous irradiations. Preliminary data in two rats revealed delayed focal necrotizing arteritic lesions and ensuing cerebral infarction in the target regions 6 months after IntMRT that likely developed weeks before the rats' death (Fig. 5). We can hypothesize that by irradiating a smaller brain volume it should be possible to avoid the biggest brain vessels and prevent these vascular damages.

Application of IntMRT to other animal models

GAERS models absence-epilepsy, a form of epilepsy that is well controlled by anti-epileptic drugs, disappears in most patients at adulthood and probably would never be a candidate for clinical IntMRT. Therefore, we are currently applying IntMRT to other animal models of epilepsy with focal seizures and that are reminiscent of epilepsies that would be candidates for such therapies.

Mesiotemporal lobe epilepsy model in mice

We first applied IntMRT to a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy (MTLE). This syndrome classically occurs in human patients several years after an initial precipitating insult (e.g., complex febrile seizures). The first seizures are generally well controlled by antiepileptic drugs (AED) but often become medically refractory. The focal seizures are characterized by a motionless stare and oro-alimentary automatisms (e.g., lip smacking, chewing)

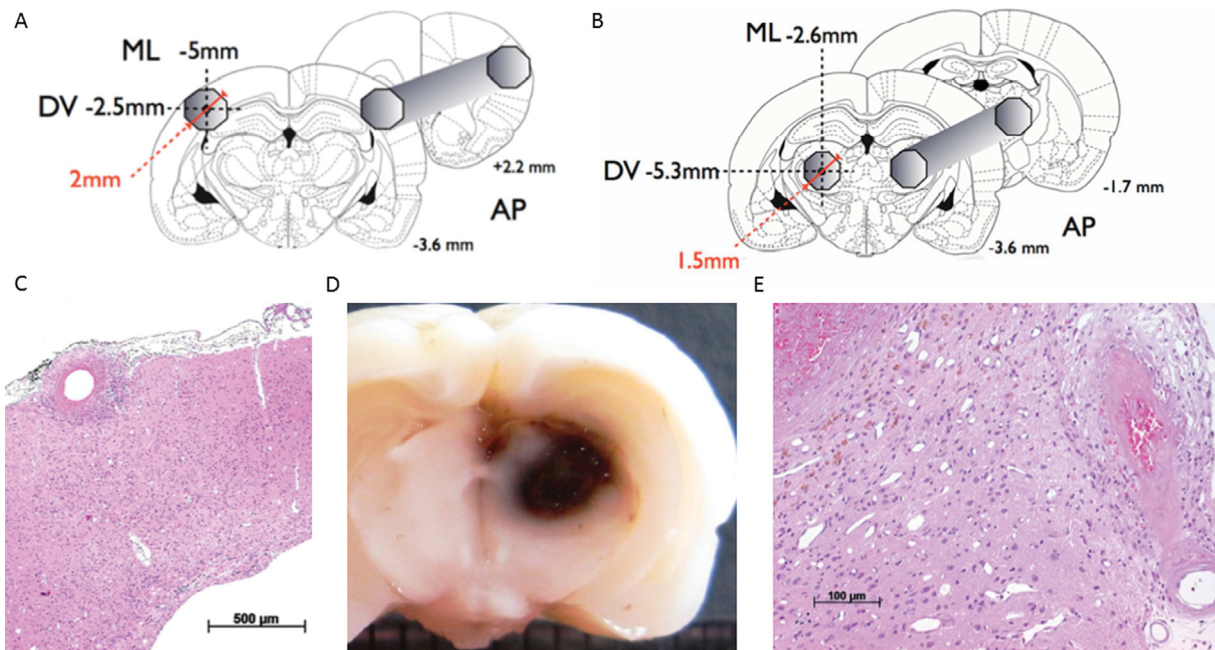


Figure 5. A, B: Coordinates for IntMRT targeting S1 Cortex (A) and thalamus (B). C–E: Necropsy of GAERS rats at 6 months after IntMRT. Histologic sections: Necrotizing arteritis (leptomeningeal artery, C and E) with subacute perifocal inflammation and hemosiderosis in the irradiated cortical S1 region (E). The damage to the cortex is moderate, in contrast to the extensive, organizing cystic macroscopic lesion with hemorrhage and brain tissue necrosis seen in the irradiated thalamus of another rat (D, millimetric scale), where fibrinoid vascular changes were also present.

associated with a progressive clouding of consciousness but rarely generalized. In addition to these clinical features, the MTLE syndrome is generally associated with a hippocampal sclerosis, mainly characterized by a selective neuronal loss in the CA1/CA3 and hilus area and a proliferation of astroglial cells within the Ammon's horn of the hippocampus and the hilus of the dentate gyrus (for review see [35]).

MTLE is the principal indication for resective surgery. Actually, about 2/3 of patients that undergo this procedure are patient suffering drug-refractory MTLE [36]. The procedure consists in surgically removing the seizure onset zone, generally the hippocampus, after functional exploration using depth electrodes. This surgery has an excellent track record showing that the hippocampus can be safely removed with minimal deleterious functional and behavioral consequences. Thus, MTLE appeared as the most logical target for a proof-of-concept application of IntMRT on drug-resistant focal epilepsy.

Several animal models of this syndrome have been developed in rats and mice (for review see Depaulis & Hamelin 2015 [37]). Among them intrahippocampal injection of kainate in mice was shown to induce ipsilateral excitotoxic damages (*i.e.*, cell loss in CA1, CA3 and dentate gyrus hilus) during the 2–3 weeks that follow the injection, as well as proliferation and hypertrophy of astrocytes and microglia, sprouting of the mossy fibers and dispersion and hypertrophy of neurons of the dentate gyrus [38–40]. These changes are restricted to the injected hippocampus and show a great similarity to the most severe type of hippocampal sclerosis, observed in up to 80% of mesial-temporal lobe resections from MTLE patients [35]. In this model, spontaneous seizures with a hippocampal onset occur regularly and remain stable in frequency and duration for months [39]. These recurrent seizures are mostly confined to the ipsilateral hippocampus with contralateral spread in some animals, but very rare generalizations to the cortex.

In order to assess the feasibility and effect of IntMRT on this model, we first injected kainate into the right hippocampus of C57Bl6 mice, and then placed custom-made bipolar carbon

electrodes (MRI compatible) in this structure. Baseline hippocampal recordings were acquired after the four-week epileptogenesis period and focal seizures were quantified. Then, we applied IntMRT to the ipsilateral dorsal hippocampus which was shown to generate seizures [41]. Among the 8 mice irradiated at 100 Gy which displayed seizures before irradiation (Fig. 6A) two presented a decrease of focal seizures at 3 weeks post-irradiation and a complete suppression at 2 and 4 months (Fig. 6C). Two other mice showed a decrease of seizures at 4 months post irradiation. The remaining 4 irradiated epileptic mice did not present any significant decrease of seizures despite histologically identifiable traces of MB (Fig. 6B) and MRI evidence of correct targeting. This lack of efficiency in 50% of mice must be pondered by the fact that epileptic hippocampus of a MTLE mouse is by definition small, irregularly shaped and located below the cortical surface. The fact that we managed to suppress seizures in 25% of the animal with no obvious deleterious behavioral effect is however encouraging to try other MRT protocols.

Current and future animal experiments

From our experience with GAERS rats and MTLE mice, we concluded that IntMRT is a unique tool that allows the deposition of high doses of radiation in restricted volumes with such a precision that a mouse hippocampus can be targeted. However, the consequences of seamless irradiation are not exempt of long-term risks. We therefore decided to pursue our future experiments using the IntMRT method but in such a fashion that only parts of the volume are irradiated. Used as such IntMRT offers the best of two worlds: (i) the deposition of high restricted doses through the MB interlacement, and (ii) the preservation of the vascular system by fractionated irradiations.

Our goal is now to assess the antiepileptic effect of this refined IntMRT method using models of refractory neocortical epilepsies in rats. Indeed, in human this type of epilepsy is frequently resistant to AED, displays considerable comorbidities [42,43] and is surgically

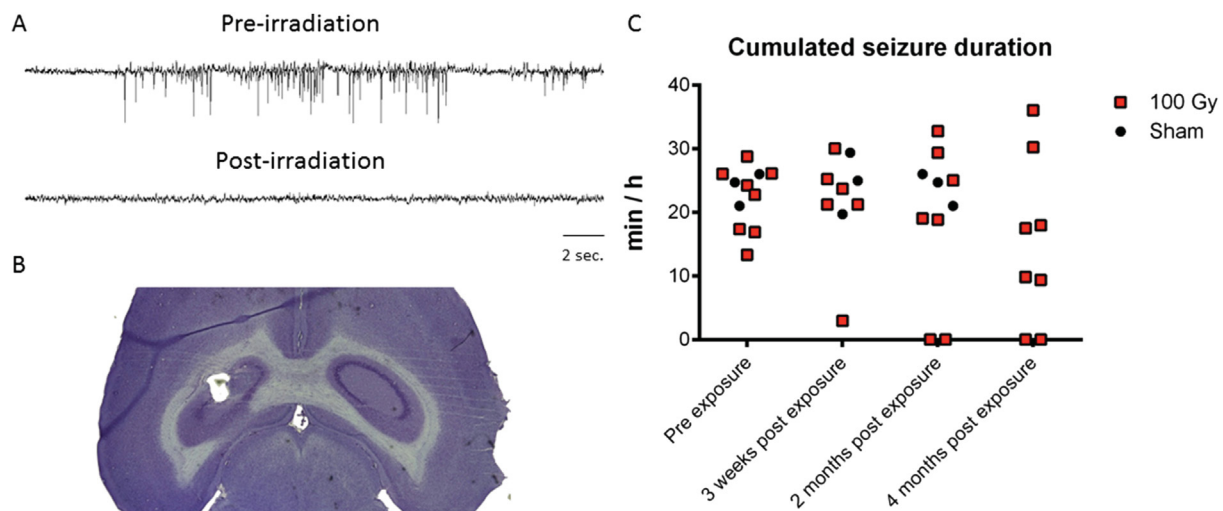


Figure 6. A. Electroencephalographic recordings from a mesiotemporal lobe epilepsy mice model before irradiation (top trace) and after IntMRT irradiation of the epileptic hippocampus (bottom trace). B. Nissl staining of an irradiated MTLTLE mice displaying the MB traces. C. Effect of IntMRT on focal hippocampal seizures in MTLTLE mice at 100 Gy (white squares, $n = 8$) and 0 Gy (black dots, $n = 3$). Note that given the electrode technology it was not always possible to record all the mice.

difficult to treat since seizures mostly arise from an eloquent cortical area.

Towards clinical applications

IntMRT should offer possible clinical applications and our consortium is currently developing pre-clinical studies towards that purpose. However, implementing IntMRT for epileptic patients is not a trivial issue and several aspects need to be addressed when considering the possibilities to develop IntMRT for clinical applications.

Which forms of epilepsy could benefit from IntMRT?

Resective surgery is currently the gold standard to treat efficiently and even cure patients with refractory epilepsies associated with focal seizures [36]. It has been greatly developed over the last twenty years due to improvements of neuroimaging, electrophysiological and neuropsychological technics (for review see Romanelli et al., 2012 [44]). Yet, such resections are not possible when the epileptogenic zone is close to or belongs to an eloquent cortex area as it would lead to dramatic neurological complications. Similarly, resection of multiple epileptic foci or subcortical ones are difficult and highly risky to perform. These forms of epilepsies are already being treated by stereotactic radiosurgical procedures using Gamma- or Cyber-Knife[®], in particular when epilepsy is secondary to brain tumors (e.g., arteriovenous malformation, cavernomas; [44]) or hypothalamic hamartomas [45]. Such techniques have also been shown to be efficient for mesiotemporal lobe epilepsy with favorable outcomes [46]. IntMRT will therefore first target these forms of epilepsies for which it would benefit from the experience of radiosurgery. Applying IntMRT to a brain area that will be later removed by surgical resection will very likely be a strategy for a proof-of-concept clinical trial in order to collect anatomical and functional information on the resected tissue to better understand the consequences of irradiation, while reducing the risks for the patients. Given our first data in animal models, it is likely that IntMRT will improve radiosurgical treatment of refractory epilepsies and/or reduce their side-effects. In addition to epilepsies associated with focal seizures, IntMRT should also allow to consider drug-resistant or difficult to treat *generalized* epilepsies such as the

Landau-Kleffner syndrome, a severe form of child epilepsy which is associated with aphasia and continuous spike-and-wave during sleep [47]. For this particular syndrome, multiple subpial transections have been proposed [48] which aim at disconnecting horizontal interneurons to reduce the synchronization of principal ones. Although good outcomes have been obtained [49] using this technic, it is greatly invasive and represents an important risk for the patients. IntMRT, by allowing very precise deposition of high doses should allow to reproduce subpial transection and/or the specific alteration of horizontal interneurons. Proof-of-concept experiments in animal models should allow us to determine whether IntMRT could be used for such approach.

The need for other mammalian models

Although quite challenging, it is necessary to develop methods which allow the irradiation of larger brains such as those of human patients. In the case of epilepsy, the application of high-flux fractionated MB in mammalian models other than rodents appears necessary before considering its application to humans. Indeed, such trials should provide evidence for antiepileptic effects of MB in species with larger brain volume and more complex symptoms and comorbidities associated with the epilepsy. One major issue for a clinical application is to take into account the complex shape of the human cortex, i.e. the gyri and sulci forming the cortical convolutions. This is indeed a real challenge as the angle of irradiation may vary according to the localization of the cortical focus to target. To this aim the use of non-human primates appears the most appropriate as their cortical architecture and somatotopic arrangement is closer to human patients [50]. Furthermore, predictive models of epilepsy have been described in macaques which should allow preclinical evaluation of the efficacy of MB [51,52]. In addition, such models would be more efficient to address the behavioral side effects of synchrotron MB irradiation, since sophisticated behavioral and cognitive tests exist in non-human primates which are much closer to human competencies than in other mammalian species. For instance, when MB irradiation targets a brain region dedicated to the motor control of the hand, behavioral tests exist in non-human primate to quantify the hand dexterity [53], a critical control that cannot be addressed in other species. The use of non-human primates should, however, be limited as much as possible

and one should consider only models with a validated clinical significance [54]. This can be envisioned at ESRF because of the existing irradiation infrastructures including an advanced patient safety system, the availability of suitable x-ray microbeams, the presence of skilled personnel and the availability of a biomedical facility near the irradiation room. Indeed, to develop new irradiation therapies it is critical to combine a clinical expertise in the surgery and radiosurgery of epilepsy.

Dosimetric and safety issues

The non-human primate studies are also essential to address the questions of dosimetric and safety issues in the purpose of human patients treatment. Studies using magnetic resonance imaging show periodic displacements in the brain of up to 1 mm in humans [55]. In the case of irradiation of non-human primates, the cyclic motion of the brain, induced by cardiac vascular movements and respiratory pulsations of the cerebrospinal fluid, imposes efforts in addition to those taken on the treatment planning for interlaced microbeams in rodent animal models [56]. Since only one port can be irradiated at a time, these movements must be understood in detail to make them predictable and ensure that irradiations from all ports happen at exactly the same point of the cyclic motion. Otherwise the precisely interlaced beams may be shifted with reference to each other and create gaps or overlapping areas leading to an inhomogeneous dose deposition in the target area. Monte Carlo dose calculations shall be used to accurately plan doses applied to non-human primates, including effects of dose blurring due to brain movement within one irradiation and movements in between different ports. The results will need to be cross-checked with experimental results from the irradiation of a suitable phantom able to reproduce the fine movements of a human brain. Using non-human primates appears therefore necessary to implement and validate all instrumental, dosimetric, safety and ethical aspects to become as close as possible to clinical standards.

Hospital implementation

The European synchrotron X-ray source in Grenoble is for now the only place in the World where preclinical trials using IntMRT are carried out on a regular time basis. The first technical developments of high flux synchrotron X-ray microbeams have been carried out for preclinical brain tumor radiation therapy. This research domain is still active and promising enough for a realistic clinical transfer in the years to come. The later application to the epilepsy presented here reinforces the interest of such X-ray sources in radiation therapy domain. These trials requires state-of-the-art technical developments for imaging and X-ray dosimetry control and are foreseen in others national or international X-ray synchrotron sources. The encouraging preclinical results shown here pave the way for future clinical applications using machines available in clinics, i.e. outside the synchrotron scientific community. The potential use of microbeam X-ray radiosurgery in the hospital environment will depend mainly on the ability of new table-top X-ray sources to produce sufficient dose-rates to perform radiosurgical procedures at acceptable cost.

Different projects aiming to build such table-top powerful X-ray sources have been funded at least in three countries: US, Germany and France. As a result extensive preclinical trials using this table-top X-ray sources are to be encouraged and foreseen.

Conclusions

In this article we review several studies in animal models of epilepsy which show the great interest of Interlaced Microbeam

Radiosurgery to block the synchronization of epileptic neuronal networks. These studies showed also the limits of these techniques by revealing the variability of their application to small irregularly shaped sub-cortical structures in the mice which do not allow a sufficient targeting accuracy. There is now a need to continue to apply IntMRT to rat models of epilepsy closer to the more severe forms of human epilepsy and to implement such radiosurgery approach to non-human primate models of epilepsy as a proof-of-concept of its feasibility in human patients.

Acknowledgments

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), a grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR “EPIRAD” n° ANR-13-BSV1-0012-01), European Synchrotron Research Facility (ESRF) and the COST Action TD1205 (SYRA3).

References

- [1] Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jönsson B, on behalf of the CDBE2010 Study Group. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol* 2011;19:155–62.
- [2] Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000;342:314–9.
- [3] ANAES. Prise en charge des épilepsies partielles pharmaco-résistantes. Haute Autorité de Santé; 2004. p. 1–27.
- [4] Kahane P. La chirurgie de l'épilepsie chez l'adulte: pour qui? *Rev Neurol* 2004;160:179–84. Spec No 1.
- [5] Régis J, Rey M, Bartolomei F, Vladyka V, Liscak R, Schröttner O, et al. Gamma knife surgery in mesial temporal lobe epilepsy: a prospective multicenter study. *Epilepsia* 2004;45:504–15.
- [6] Romanelli P, Anselmi DJ. Radiosurgery for epilepsy. *Lancet Neurol* 2006;5:613–20.
- [7] Sims E, Doughty D, Macaulay E, Royle N, Wraith C, Darlison R, et al. Stereotactically delivered cranial radiation therapy: a ten-year experience of linac-based radiosurgery in the UK. *Clin Oncol R Coll Radiol* 1999;11:303–20.
- [8] St George EJ, Kudrath J, Perks J, Plowman PN. Acute symptoms after gamma knife radiosurgery. *J Neurosurg* 2002;97:631–4.
- [9] Romanelli P, Bravin A. Synchrotron-generated microbeam radiosurgery: a novel experimental approach to modulate brain function. *Neurol Res* 2011;33(8):825–31.
- [10] Zeman W, Curtis HJ, Gebhard KL, Haymaker W. Tolerance of mouse brain tissue to high energy deuterons. *Science* 1959;130:1760–1.
- [11] Curtis HJ. The interpretation of microbeam experiments for manned space flight. *Radiat Res Suppl* 1967;7:258–64.
- [12] Curtis HJ. The use of deuteron microbeam for simulating the biological effects of heavy cosmic-ray particles. *Radiat Res Suppl* 1967;7:250–7.
- [13] Zeman W, Curtis HJ, Baker CP. Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on the visual cortex of the mouse brain. *Radiat Res* 1961;15:496–514.
- [14] Anselmi DJ, Bravin A, Romanelli P. Microbeam radiosurgery using synchrotron-generated submillimetric beams: a new tool for the treatment of brain disorders. *Neurosurg Rev* 2011;34:133–42.
- [15] Slatkin D, Spanne P, Dilmanian F, Sandborg M. Microbeam radiation-therapy. *Med Phys* 1992;19:1395–400.
- [16] Slatkin DN, Spanne P, Dilmanian FA, Gebbers JO, Laissue JA. Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8783–7.
- [17] Laissue JA, Blattmann H, Di Michiel M, Slatkin DN, Lyubimova N, Guzman R, et al. The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (microbeam radiation therapy) in pediatric neuro-oncology. In: *Proc. SPIE 4508, Penetrating Radiation Systems and Applications III*; 2001. p. 65.
- [18] Serduc R, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, Bouchet A, Pouyatos B, Carron R, et al. High-precision radiosurgical dose delivery by interlaced microbeam arrays of highflux low-energy synchrotron X-rays. *PLoS One* 2010;5:e9028.
- [19] Prayson RA, Yoder BJ. Clinicopathologic findings in mesial temporal sclerosis treated with gamma knife radiotherapy. *Ann Diagn Pathol* 2007;11:22–6.
- [20] Rheims S, Didelot A, Guenot M, Régis J, Ryvlin P. Subcontinuous epileptiform activity after failed hippocampal radiosurgery. *Epilepsia* 2011;52:1425–9.
- [21] Mori Y, Kondziolka D, Balzer J, Fellows W, Flickinger JC, Lunsford LD, et al. Effects of stereotactic radiosurgery on an animal model of hippocampal epilepsy. *Neurosurgery* 2000;46:157–65. discussion 165–8.
- [22] Maesawa S, Kondziolka D, Dixon CE, Balzer J, Fellows W, Lunsford LD. Subnecrotic stereotactic radiosurgery controlling epilepsy produced by kainic acid injection in rats. *J Neurosurg* 2000;93:1033–40.
- [23] Chen Z, Kamiyori T, Henson S, Yamamoto H, Bertram E, Schottler F, et al. Anticonvulsant effects of gamma surgery in a model of chronic spontaneous limbic epilepsy in rats. *J Neurosurg* 2001;94:270–80.

- [24] Quigg M, Rolston J, Barbaro NM. Radiosurgery for epilepsy: clinical experience and potential antiepileptic mechanisms. *Epilepsia* 2012;53:7–15.
- [25] Pouyatos B, Serduc R, Chipaux M, Chabrol T, Bräuer-Krisch E, Nemoz C, et al. Synchrotron x-ray interlaced microbeams suppress paroxysmal oscillations in neuronal networks initiating generalized epilepsy. *Neurobiol Dis* 2013;51:152–60.
- [26] Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;55:27–57.
- [27] Depaulis A, Van Lijstelaar EL. Genetic models of absence epilepsy in the rat. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, editors. *Models of seizures and epilepsy*. London: Elsevier; 2005. p. 233–48.
- [28] Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 2007;27:6590–9.
- [29] David O, Guillemain I, SAILLET S, REYT S, DERANSART C, SEGEARTH C, et al. Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol* 2008;6:2683–97.
- [30] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2007. p. 456.
- [31] Siegbahn EA, Bräuer-Krisch E, Bravin A, Nettelbeck H, Lerch ML, Rosenfeld AB, et al. MOSFET dosimetry with high spatial resolution in intense synchrotron generated x-ray microbeams. *Med Phys* 2009;36:1128–37.
- [32] Serduc R, Vérant P, Vial JC, Farion R, Rocas L, Rémy C, et al. In vivo two-photon microscopy study of short term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:1519–27.
- [33] Yoshii Y, Phillips TL. Late vascular effects of whole brain X-irradiation in the mouse. *Acta Neurochir* 1982;64:87–102.
- [34] Münter MW, Karger CP, Reith W, Schneider HM, Peschke P, Debus J. Delayed vascular injury after single high-dose irradiation in the rat brain: histologic, immunohistochemical and angiographic studies. *Radiology* 1999;212:475–82.
- [35] Hamelin S, Depaulis A. Revisiting hippocampal sclerosis in mesial temporal lobe epilepsy according to the “two-hit hypothesis”. *Rev Neurol* 2015;171:227–35.
- [36] Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M, Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001;345:311–8.
- [37] Depaulis A, Hamelin S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: the end of a misunderstanding? *Rev Neurol* 2015;171:217–26.
- [38] Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sørensen JC, Onteniente B. Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 1995;64:665–74.
- [39] Riban V, Bouillere V, Phàm-Lê BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2002;112:101–11.
- [40] Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, et al. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci* 2006;26:4701–13.
- [41] Pallud J, Häussler U, Langlois M, Hamelin S, Devaux B, Deransart C, et al. Dentate gyrus and hilus transection blocks seizure propagation and granule cell dispersion in a mouse model for mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2011;21:334–43.
- [42] Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003;16:165–70.
- [43] Thomas JE, Reagan TJ, Klass DW. *Epilepsia partialis continua*. A review of 32 cases. *Arch Neurol* 1977;34:266–75.
- [44] Romanelli P, Striano P, Barbarisi M, Coppola G, Anselmi DJ. Non-resective surgery and radiosurgery for treatment of drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2012;99:193–201.
- [45] Régis J, Scavarda D, Tamura M, Nagaya M, Villeneuve N, Bartolomei F, et al. Epilepsy related to hypothalamic hamartomas : surgical management with special reference to gamma knife surgery. *Childs Nerv Syst* 2006;22:881–95.
- [46] Bartolomei F, Hayashi M, Tamura M, Rey M, Fischer C, Chauvel P, et al. Long-term efficacy of gamma knife radiosurgery in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2008;70(19):1658–63.
- [47] Rotenberg J, Pearl PL. Landau-Kleffner syndrome. *Arch Neurol* 2003;60(7):1019–21.
- [48] Morrell F, Whisler WW, Bleck TP. Multiple subpial transection: a new approach to the surgical treatment of focal epilepsy. *J Neurosurg* 1989;70:231–9.
- [49] Spencer SS, Schramm J, Wyler A, O'Connor M, Orbach D, Krauss G, et al. Multiple subpial transection for intractable partial epilepsy: an international meta-analysis. *Epilepsia* 2002;43:141–5.
- [50] Sessle BJ, Wiesendanger M. Structural and functional definition of the motor cortex in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Physiol* 1982;323:245–65.
- [51] Ribak CE, Seress L, Weber P, Epstein CM, Henry TR, Bakay RA. Alumina gel injections into temporal lobe of rhesus monkeys cause complex partial seizures and morphological changes found in human temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 1998;401(2):266–90.
- [52] Devergnas A, Piallat B, Prabhu S, Torres N, Benabid AL, David O, et al. The subcortical hidden side of focal motor seizures: evidence from micro-recordings and local field potentials. *Brain* 2012;135:2263–76.
- [53] Schmidlin E, Kaeser M, Gindrat AD, Savidan J, Chatagny P, Badoud S, et al. Behavioral assessment of manual dexterity in non-human primates. *J Vis Exp* 2011;57:3258.
- [54] Guillemain I, Kahane P, Depaulis A. Animal models to study aetiology of epilepsy: what are the features to model? *Epileptic Disord* 2012;14:217–25.
- [55] Maier SE, Hardy CJ, Jolesz FA. Brain and cerebrospinal fluid motion: real-time quantification with M-mode MR imaging. *Radiology* 1994;193(2):477–83.
- [56] Kao YH, Guo WY, Liou AJK, Chen TY, Huang CC, Chou CC, et al. Transfer function analysis of respiratory and cardiac pulsations in human brain observed on dynamic magnetic resonance images. *Comput Math Methods Med* 2013:157040.

Annexe 2

Building Up Absence Seizures in the Somatosensory Cortex: From Network to Cellular Epileptogenic Processes

G Jarre ^{*}, T Altwegg-Boussac ^{*}, M S Williams, F Studer, M Chipaux,
O David, S Charpier, A Depaulis, S Mahon [#] and I Guillemain [#]

* these authors equally contributed to this study

these authors co-supervised the study

Manuscrit soumis à *Cerebral Cortex* en Janvier 2016

Révisé en Novembre 2016

Révisé en Juin 2017

ORIGINAL ARTICLE

Building Up Absence Seizures in the Somatosensory Cortex: From Network to Cellular Epileptogenic Processes

Guillaume Jarre^{1,2}, Tristan Altwegg-Boussac³, Mark S. Williams³, Florian Studer^{1,2}, Mathilde Chipaux⁴, Olivier David^{1,2,5}, Stéphane Charpier^{3,6}, Antoine Depaulis^{1,2,5}, Séverine Mahon³ and Isabelle Guillemain^{1,2}

¹Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France, ²Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France, ³Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France, ⁴Pediatric Neurosurgery Department, Fondation Ophtalmologique A. de Rothschild, 75019 Paris, France, ⁵CHU de Grenoble, F-38000 Grenoble, France and ⁶UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France

Address correspondence to Isabelle Guillemain, Grenoble-Institut des Neurosciences, Université Grenoble-Alpes – Faculté de Médecine, Chemin Fortuné Ferrini, BP170, 38042 Grenoble cedex 9, France. Email: isabelle.guillemain@univ-grenoble-alpes.fr; Séverine Mahon, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France. Email: severine.mahon@upmc.fr

Guillaume Jarre and Tristan Altwegg-Boussac equally contributed to this study
Séverine Mahon and Isabelle Guillemain co-supervised the study

Abstract

The epileptogenic processes leading to recurrent seizures in Genetic Epilepsies are largely unknown. Using the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg, we investigated *in vivo* the network and single neuron mechanisms responsible for the early emergence of epileptic activity. Local field potential recordings in the primary somatosensory cortex (SoCx), from the second post-natal week to adulthood, showed that immature cortical discharges progressively evolved into typical spike-and-wave discharges following a 3-step maturation process. Intracellular recordings from deep-layer SoCx neurons revealed that this maturation was associated with an age-dependent increase in cortical neurons intrinsic excitability, combining a membrane depolarization and an enhancement of spontaneous firing rate with a leftward shift in their input–output relation. These cellular changes were accompanied by a progressive increase in the strength of the local synaptic activity associated with a growing propensity of neurons to generate synchronized oscillations. Chronic anti-absence treatment before the occurrence of mature cortical discharges did not alter epileptogenesis or the drug efficiency at adulthood. These findings demonstrate that recurrent absence seizures originate from the progressive acquisition of pro-ictogenic properties in SoCx neurons and networks during the post-natal period and that these processes cannot be interrupted by early anti-absence treatment.

Key words: absence epilepsy, early anti-epileptic treatment, epileptogenesis, GAERS, *in vivo* intracellular recordings, somatosensory cortex

Introduction

Idiopathic Generalized Epilepsies, now called Genetic Epilepsies (GE) by the International League Against Epilepsy (ILAE) (Berg and Scheffer 2011), represent one-third of all epilepsies (Panayiotopoulos 2005). These epilepsies, most often diagnosed during childhood, are not associated with clear-cut inciting events or detectable structural brain abnormalities (Shorvon 2011) and their early onset suggests that ictogenic processes take place during brain development and maturation (Sanchez and Jensen 2001; Ben-Ari and Holmes 2006, Russo et al. 2016). While understanding the epileptogenic mechanisms occurring during this critical period is 1 of the major challenges in epilepsy research to develop strategies for preventive treatments (Baulac and Pitkänen 2009; Kelley et al. 2009), the cellular and network dysfunctions leading to the emergence of recurrent generalized seizures remain poorly understood (Pitkänen and Engel 2014). The current clinical investigations of genetic epilepsy ontogenesis using electroencephalographic (EEG) or brain imaging approaches are limited due to 1) the early age of seizures onset, 2) the fact that anti-epileptic drug therapy, generally initiated soon after the diagnosis, represents a confounding factor, and 3) the difficulty to set up longitudinal EEG recordings for several years (Grosso et al. 2005; Hirsch and Panayiotopoulos 2005).

Genetic animal models provide a first-choice alternative to study the mechanisms underlying GEs' epileptogenesis (Consroe et al. 1980; Frankel 2005; Löscher 2011; Guillemain et al. 2012). In particular, rodent models of absence epilepsy (AE), such as GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg) and WAG/Rij rats (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk), have proven to be highly relevant for the study of the pathophysiology of this prototypic form of GE (Danover et al. 1998; Depaulis and Van Luijtelaar 2006; Depaulis et al. 2016). In both rat strains, spike-and-wave discharges (SWDs), the EEG hallmark of absence seizures, are initiated in adults within the deep layers of the primary somatosensory cortex (SoCx) (Meeren et al. 2002; Polack et al. 2007, 2009; David et al. 2008) by a population of pyramidal neurons exhibiting specific pro-ictogenic electrophysiological properties, combining a depolarized membrane potential and an elevated spontaneous firing rate with an increased intrinsic excitability (Polack et al. 2007, 2009; Williams et al. 2016). Previous ontogenic studies in GAERS and WAG/Rij rats reported age-dependent changes in the number and duration of SWDs in mature animals (Vergnes et al. 1986; Coenen and van Luijtelaar 2003), accompanied by modifications in the density of various voltage-gated ion channels in the SoCx (Klein et al. 2004; Kole et al. 2007). Moreover, recent works showed that several months of chronic treatment with anti-epileptic drugs, administered before and after the known onset of mature SWDs, could reduce the number of seizures and prevent changes in ion channels expression (Blumenfeld et al. 2008; Russo et al. 2010, 2011; Sarkisova et al. 2010; van Luijtelaar et al. 2013; Dezsi et al. 2013; for review, see Russo et al. 2016). Yet, it remains unclear whether anti-epileptic medications restricted to the period preceding the occurrence of SWDs are sufficient to alter the epileptogenic processes.

To investigate the sequential changes taking place in SoCx neurons and networks during epileptogenesis, we performed local field potentials (LFPs) in GAERS and control Wistar rats at different ages, from the 10th (P10) to the 90th (P90) post-natal day, and characterized the electrical membrane properties and synaptic drive of deep-layer pyramidal neurons using *in vivo* intracellular recordings. Our findings establish that the first epileptiform events were detected in GAERS at the beginning of the third week of life, starting with cortical oscillatory

discharges that progressively evolve with age into mature SWDs. Maturation of epileptic activities was associated with dynamical changes in the intrinsic excitability of SoCx neurons together with an augmented synchrony within local synaptic networks. We finally demonstrated that a chronic treatment with anti-absence drugs before the emergence of SWDs was ineffective for preventing epileptogenic processes and does not affect drug efficiency at adulthood.

Materials and Methods

Ethics Approval

The care and experimental manipulation of the animals were carried out in accordance with the guidelines of the European Union (directive 2010/63/EU) and approved by the Ethical Committees on Animal Experimentation of the "Grenoble-Institut des Neurosciences" and the "Institut du Cerveau et de la Moelle épinière".

Local Field Potential Recordings in Freely Moving Rats

Animals

LFP recordings were performed on GAERS (Grenoble Alpes University, France) aged from P10 to P90 (P10–P14, $n = 9$; P14–P18, $n = 8$; P17–P21, $n = 2$; P20–P24, $n = 9$; P23–P27, $n = 8$; P26–P30, $n = 7$; P40–P60, $n = 4$; P90, $n = 19$), and age-matched control Wistar rats (P10–14, $n = 8$; P17–21, $n = 4$; P23–27, $n = 7$) of either sex. Animals were maintained in cages with food and drink *ad libitum* with controlled temperature (21 to 23 °C) and light cycling (12 h/12 h; light period from 7 a.m. to 7 p.m.). All pups were housed with their mothers until weaning at P30.

Electrodes Implantation

GAERS and Wistar rats were stereotaxically implanted in the primary somatosensory cortex (SoCx) and/or motor cortex (MoCx) with bipolar electrodes (enameled copper wire, \varnothing 220 μ m, Block Germany), under generalized anesthesia. For pups <P20, anesthesia was induced with 4% isoflurane in air and maintained with 1% isoflurane during surgery. P20–P60 rats were anesthetized using a mixture of xylazine (5–10 mg/kg *i.p.*; Rompun[®], Centravet) and ketamine (40–100 mg/kg *i.p.*; Clorketam1000[®], Vetoquinol, Centravet). Incisions and compression points were repeatedly infiltrated with lidocaine (2%; Centravet). The stereotaxic coordinates for SoCx in adult rats were antero-posterior from bregma (AP): -1.3 mm; medio-lateral (ML): 5.0 mm; dorso-ventral (DV): -3.0 mm, and for MoCx, AP: $+1.0$ mm; ML: 2.0 mm; DV: -1.0 mm (Paxinos and Watson 1986). For pups, these coordinates were individually adapted from the adult ones using the bregma-lambda distance to determine the adult/pup ratio. All the electrodes were soldered to a female micro-connector (BLR150Z; Fischer Elektronik). After surgery, the pups were returned to their litter and mothers were observed to resume normal feeding and nesting behaviors. Animals under chronic pharmacological treatment were implanted at P32–33 with 4 single contact epidural stainless-steel electrodes placed bilaterally over the frontal and parietal cortices. An additional single contact electrode was positioned over the right cerebellum and served as the reference. Animals were allowed to recover for 2 days and were then recorded 1 h twice a week during 1 month and once per week thereafter. At the end of experiments, animals were euthanized by an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, *i.p.*) and brains were removed, frozen at -50 °C in isopentane and cut in coronal sections for histological

processing. Brain sections were then stained with cresyl violet to localize each electrode tip.

Video-LFP Recordings

After the post-surgery recovery period, rats were connected to a computer-assisted video-EEG system (System-Plus Evolution®, Micromed). LFP recordings were acquired at 1024 Hz and band-pass filtered between 1–200 Hz. LFP signals, synchronized with the video, were recorded during 1 h in freely moving conditions. The occurrence of cortical discharges in the LFP was always confirmed with the video.

Detection of Cortical Discharges

The onset (or end) of a cortical discharge at Stages 2 and 3 was defined as the first (or last) epileptiform event with an amplitude of at least 3 times the standard deviation (SD) of the baseline LFP signal. In agreement with previous studies on AE epileptogenesis (Carçak et al. 2008; Ellens et al. 2009; Akin et al. 2011), this detection criterion was reduced to ≥ 2 times the SD of the baseline activity for Stage 1 cortical discharges because of their relatively lower amplitude. Only cortical discharges that lasted more than 1 s were included in the analysis and, to avoid selecting sleep-related oscillations, detection was limited to periods of wakefulness. Oscillatory discharges at Stage 1 could be easily distinguished from the 7–14 Hz sleep spindles/spindle bursts (Pinault et al. 2001, 2006; Yang et al. 2009) by their lower internal frequency that ranged from 4 to 6 Hz. Regardless of the stage of epileptogenesis, detection of each cortical discharge was validated using the video to differentiate epileptiform events from physiological activity patterns associated with sleep, exploratory behavior, or grooming (for review, see Danober et al. 1998; Depaulis et al. 2016).

LFP Signals Analysis

Time-frequency and spectral analyses of cortical discharges were performed using an in-house developed Matlab code for dynamical analysis of intra-cortical LFPs. For each cortical discharge, the amplitude (square-root of power) of oscillatory activity between 1 and 30 Hz, from 4 s before the onset and up to 4 s thereafter, was obtained using standard methods based on Hanning taper analysis with fixed time-window length set at 2.5 s (Percival and Walden 1993). Time-frequency sampling of the time-frequency plane was 0.1 s/0.2 Hz. The time-frequency plane was averaged over events after having linearly adjusted the duration of the discharges to the same arbitrary value. Finally, the amplitude spectra of the cortical discharges were obtained by averaging the amplitude values over time during the whole duration of the discharges. The median of the amplitude spectra over events was chosen to summarize the spectral properties of each stage. For unitary epileptiform event analysis (Fig. 3), only discharges with an amplitude ≥ 3 times (Stages 2 and 3) and 2 times (Stage 1) the SD of the baseline LFP signal were considered.

Pharmacological Experiments

Acute Injection of Anti-epileptic Drugs in Young Pups

After a baseline recording period of 30 min, animals aged between P25 and P30 received either ethosuximide (ETHX, 200 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich), valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) or saline injection in a counter-balanced order so that each animal was used as its own control. Between 2 injections, a delay of at least 48 h was observed for drug elimination/clearance.

Chronic Treatment with Anti-epileptic Drug in Young Pups

Twenty-one GAERS pups from 2 different litters were divided into 3 groups of 7 pups and were injected daily from P5 to P25 with either ethosuximide (ETHX group, 200 mg/kg/day, i.p., $n = 7$; Blumenfeld et al. 2008), valproate (VPA group, 200 mg/kg/day, i.p., $n = 7$) or saline (Saline group, $n = 7$) (Fig. 7A). All pups were housed with their mother until P30 and their weight and general body condition were controlled each day to detect any drug-induced side effects on animal's development. Particular attention was paid to the possible appearance of lethargic behavior, stirring or pain. We did not observe any weight differences between the 3 groups throughout the treatment period (data not shown).

Sensitivity to Acute Anti-epileptic Drugs Injection in Pre-treated Adult Animals

Each group of pre-treated animals (11 weeks old) received 2 doses of ethosuximide (25 mg/kg and 200 mg/kg, i.p.), valproate (75 mg/kg and 200 mg/kg, i.p.) and saline in a counter-balanced order to test their sensitivity to these drugs at adulthood (Micheletti et al. 1985) (Fig. 7A). A delay >72 h was observed between the 2 injections to ensure drug elimination/clearance. LFP recordings were performed 30 min before (baseline) and during 1 h after drug injection. Then, the number, cumulated and mean duration of cortical discharges were compared between conditions.

Simultaneous In Vivo Electrographic and Intracellular Recordings

Combined intracellular and electrocorticographic (ECoG) recordings were performed on GAERS, aged from P17 to $P \geq 90$ (P17, $n = 5$; P30, $n = 5$; $P \geq 90$, $n = 8$), and on age-matched control Wistar rats (P17, $n = 4$; P30, $n = 4$; $P \geq 90$, $n = 10$) of either sex. Rats were initially anesthetized with isoflurane (1–4% in air) for surgery, and then maintained in a sedated state by repeated injections of fentanyl (3 μ g/kg, i.p.; Janssen-Cilag; Polack et al. 2007). Incision and compression points were infiltrated with lidocaine (2%; Centravet). A small craniotomy was made above the primary SoCx (AP: -1 to -2 mm from bregma; ML: 4–5.5 mm; Paxinos and Watson 1986) to insert intracellular and ECoG electrodes. Stereotaxic coordinates for P17–P30 rats were adapted from adult coordinates as indicated above. To favor long-lasting stable intracellular recordings, rats were immobilized with gallamine triethiodide (40 mg/2 h, i.m.; Sigma-Aldrich, France) and artificially ventilated (Depaulis et al. 2016).

ECoG activity was monitored using a low impedance (~ 60 k Ω) silver electrode placed on the dura above the primary SoCx and a reference electrode inserted in a neck muscle. ECoG signals were captured using a differential AC amplifier (Model 1700; A-M Systems), filtered at 1 Hz–10 kHz and digitized at 1–3 kHz (CED 1401plus; Cambridge Electronic Design). Intracellular recordings were performed using glass micropipettes filled with 2 M potassium acetate (50–70 M Ω). Intracellular signals were amplified using an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices) operating in bridge mode, filtered at 3 kHz and digitized at 15–20 kHz. Intracellular recordings were made at depth > 1 mm (from 1.05 to 3.30 mm) below the cortical surface to ascertain targeting layers 5–6 cortical pyramidal neurons regardless of the age of the animals (Franceschetti et al. 1998; Frick et al. 2007; Polack et al. 2007). The mean depth of recordings was 1456.8 ± 61.6 μ m at P17 ($n = 23$ neurons from 5 GAERS and 4 Wistar rats), 1712.2 ± 110.7 μ m at P30 ($n = 17$ neurons from 5 GAERS and 4 Wistar rats) and 2146.1 ± 138.3 μ m at $P \geq 90$ ($n = 23$ neurons from 8 GAERS

and 10 Wistar rats). Pyramidal neurons were identified by their action potential (AP) properties and firing responses to supra-threshold current pulses. AP half-width was >0.5 ms, a value typically larger than that reported for GABAergic interneurons (Goldberg et al. 2011). As classically described for pyramidal cortical neurons (Connors and Gutnick 1990), recorded cells in adult animals were either regular spiking or intrinsically bursting (Fig. 5A).

ECoG and Intracellular Signal Analysis

Spontaneous firing rate of cortical neurons was measured from recording periods ($n = 2\text{--}5/\text{neuron}$) of 10–60 s. The coefficient of variation (CV2) of inter-spike intervals (ISIs), which compares adjacent intervals and is independent of firing rate variation (Holt et al. 1996), was calculated as follows: $CV2 = (2 |\Delta t_{i+1} - \Delta t_i|) / (\Delta t_{i+1} + \Delta t_i)$, where Δt_i defined the ISIs. Average membrane potential (V_m) values and the magnitude of V_m fluctuations (V_m SD) were assessed, in between cortical discharges, from recording segments ($n = 2\text{--}5/\text{neuron}$) of intracellular activity lasting 10–60 s after removal of APs. AP voltage threshold was defined as the membrane potential at which dV/dt first exceeds 10 V/s (Mahon et al. 2003). The amplitude of APs was calculated as the potential difference between the voltage threshold and the peak after averaging at least 10 waveforms and their duration was measured as the width at half-maximal amplitude. Membrane input resistance (R_m) was calculated during baseline periods, from averaged ($n \geq 10$) voltage deflections induced by low intensity hyperpolarizing current pulses (-0.4 nA, 100–200 ms duration, every 1.25 s). The membrane time constant (τ_m) was derived from an exponential decay fit applied to the current-evoked hyperpolarization. To perform cross-correlations between ECoG and V_m recordings, intracellular voltage traces were median filtered and both signals were down-sampled at 0.5–1 kHz after removal of the DC component.

To quantify the transfer function of cortical neurons, we generated firing frequency versus injected current (F–I) relationships. The firing rate was measured in response to depolarizing current pulses of increasing intensity (0.1–1.2 nA, 100–200 ms, every 2.25–3.25 s). Since the current-evoked firing could exhibit a trial-to-trial variability due to collisions with the background synaptic activity inherent to *in vivo* preparations, current pulses of a given intensity were applied 15–25 times and the corresponding firing responses were averaged. As previously described (Mahon and Charpier 2012), we applied linear regressions to F–I curves and determined the threshold current for AP generation, extrapolated as the x-intercept of the linear fit, and the neuronal gain, defined as the slope (γ) of the F–I curve. All data were analyzed using Spike2 version 7.06 (Cambridge Electronic Design) and Origin version 8.1 (OriginLab Corporation) softwares.

Statistical Analysis

Numerical values are given as mean \pm s.e.m and statistical analyses were done with Prism version 6.05 (Graphpad software Inc.) or SigmaStat version 3.5 (Systat Software Inc.). The different tests and post hoc corrections used for each experiment are mentioned in each figure legend.

Results

Post-natal Evolution of Epileptiform Discharges in the Somatosensory Cortex of Freely Moving GAERS

We first explored the ontogenesis of absence seizures by performing, on freely moving GAERS from P10 to P90, LFP

recordings in the primary somatosensory cortex (SoCx), previously identified as the cortical region initiating absence seizures in the adult (Polack et al. 2007; 2009; David et al. 2008). Between P10 and P14, no epileptiform activities could be detected and the comparison of LFP frequency content (1–30 Hz) between GAERS and age-matched control Wistar did not reveal significant differences (data not shown, $n = 9$ GAERS and 8 Wistar; $P > 0.05$, 2-way ANOVA with Sidak's correction). Recurrent oscillatory discharges first appeared in the GAERS SoCx at P15 (Fig. 1A1). We then observed a progressive evolution of these early epileptiform activities into SWDs as the animals matured (Fig. 1A,B, insets). According to the morphology of the individual epileptiform activities, their proportion and internal frequency, we identified 3 distinct stages in the maturation of cortical discharges (Fig. 1A–D).

Stage 1

From P15 to the beginning of the fourth post-natal week (P22), cortical discharges were devoid of classical spike-and-wave (SW) complexes and exclusively composed of oscillatory-like waves (Fig. 1A1,B1, inset). These oscillatory discharges had a fundamental internal frequency of 5.5 ± 0.1 Hz ($n = 50$ cortical discharges from 6 GAERS) (Fig. 1A1,B1) and were present in 62.5% of GAERS at P15 ($n = 5$ out of 8 GAERS) and in all animals at P20 ($n = 11$ GAERS). Long-term duration (≥ 1 h) spectral analysis of LFP recordings from GAERS and Wistar rats at P21 confirmed that 5-Hz oscillations were only present in epileptic animals ($n = 6$ GAERS and 4 Wistar; $P < 0.05$) (Fig. 1C, top panels). Moreover, as soon as Stage 1, oscillatory discharges were associated with behavioral arrest, often accompanied by chewing or slight hypotonia of the neck muscles (see Supplementary Video 1). Thus, the 5-Hz oscillatory discharges, characteristic of GAERS between P15 and P22, likely represent activities that can be considered as an electrical signature of the first stage of epileptogenesis.

Stage 2

From P25 to P40, the oscillatory cortical discharges were replaced by epileptiform activities composed of oscillations intermingled with sharp and narrow events closely resembling SW complexes (Fig. 1A2,B2, inset). Oscillations were defined by negative, nearly symmetrical, LFP deflections that were not followed by a consecutive wave, contrasting with the dual profile of SW complexes (Fig. 1B2, inset). During Stage 2, oscillations predominated over SW but their proportion progressively decreased with age ($71.4 \pm 2.9\%$ at P25, $70.4 \pm 4.2\%$ at P30 and $53.4 \pm 3.9\%$ at P40) (Fig. 1D). Spectral analysis revealed that these mixed cortical discharges had a fundamental frequency of 5.2 ± 0.08 Hz, followed by a second harmonic at 10.4 ± 0.1 Hz that was absent during Stage 1 ($n = 50$ mixed cortical discharges from 8 GAERS) (Fig. 1B2). Cortical discharges at Stage 2 were also specific of epileptic animals as evidenced by the increased power of the 5–6 Hz frequency band in GAERS at P25 compared to age-matched control Wistar rats ($n = 7$ GAERS and 7 Wistar; $P < 0.001$) (Fig. 1C, lower panels). As for Stage 1, behavioral arrest, chewing and/or slight neck muscles hypotonia were observed during the mixed cortical discharges (see Supplementary Video 2).

Stage 3

We defined the beginning of Stage 3 as the post-natal time at which cortical discharges were composed of more than 50% of SW complexes (Fig. 1A3,B3,D). This took place after P40 since the proportion of SW pattern reached $75.4 \pm 1.1\%$ at P60 ($n = 4$ GAERS) and $78.7 \pm 1.8\%$ at P90 ($n = 19$ GAERS) (Fig. 1D). Stage 3 discharges had a preferential internal frequency of 7.3 ± 0.05 Hz,

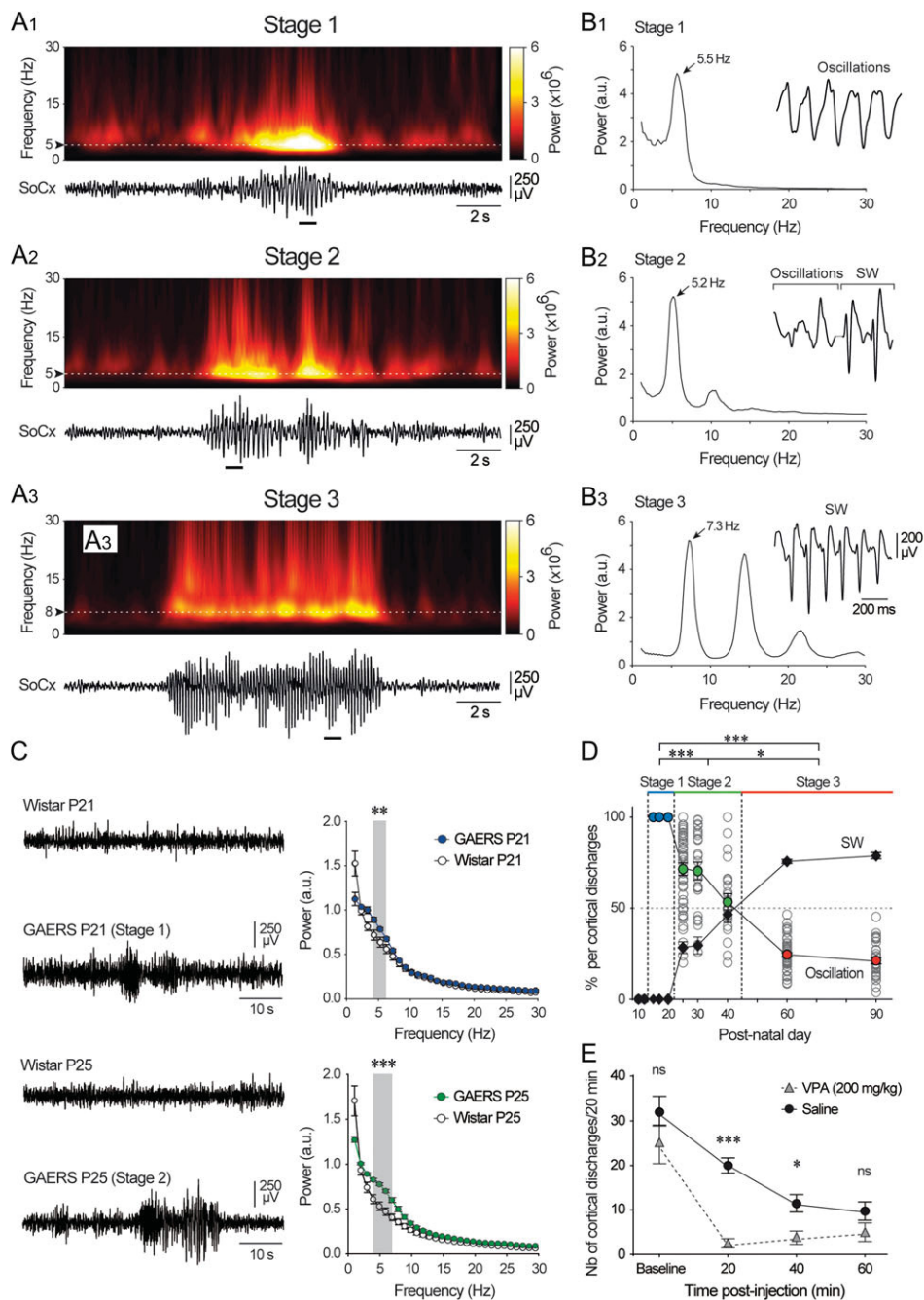


Figure 1. Progressive evolution of cortical discharges during epileptogenesis. (A) Typical LFP recordings in the primary somatosensory cortex (SoCx) of freely moving GAERS (bottom record) and corresponding color-coded time-frequency plot of amplitude (top) using standard Hanning taper analysis after removal of the DC component at different stages of epileptogenesis. (A1) Stage 1: P18, (A2) Stage 2: P25 and (A3) Stage 3: P90. (B) Median normalized amplitude power spectra from LFP signals ($n = 50$ discharges/stage in $n \geq 5$ animals) recorded at Stage 1 (B1), Stage 2 (B2) and Stage 3 (B3). The fundamental frequency for the 3 stages is indicated. The inset is an expanded view of the underlined part of cortical discharges in (A), illustrating their main morphological characteristics. Calibration bars in (B3) applied to (B1–B2). (C) Representative LFP recordings from GAERS at P21 (Stage 1) and P25 (Stage 2) and from age-matched control Wistar rats (left) with corresponding normalized power spectra (right). The gray areas delineate significant differences in spectral power between GAERS and Wistar rats. (D) Relative proportion of oscillations (color-coded circles) and SW (black diamond) per cortical discharges as a function of age. Each open circle represents the percentage of oscillations per cortical discharge ($n \geq 25$ cortical discharges in $n \geq 4$ GAERS) and filled circles or diamonds represent mean \pm s.e.m. (E) Number of cortical discharges per 20 min period recorded in GAERS at Stage 2 (P25–P30) after intraperitoneal valproate (VPA, 200 mg/kg) or saline injection. Significance was assessed using 2-way ANOVA with Sidak's post hoc correction (power-spectrum), Kruskal–Wallis ANOVA on ranks with Dunn's post hoc correction (relative proportion of oscillations) and 2-way ANOVA with Sidak's post hoc correction (VPA injection). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

similar to that of SWDs in adult GAERS (Polack et al. 2007; Depaulis et al. 2016) together with a second and third harmonic at 14.6 ± 0.1 and 21.9 ± 0.1 Hz, respectively ($n = 50$ SW cortical discharges from 8 GAERS) (Fig. 1A3,B3). Concomitantly with

these mature cortical discharges, animals displayed behavioral arrest accompanied with whisker twitching and/or chewing and, in most animals, hypotonia of the neck muscles. These behavioral correlates were more stereotyped compared to Stages 1–2

and similar to those classically described in adult GAERS (Danober et al. 1998) (see Supplementary Video 3).

Because absence seizures in adult GAERS are known to be suppressed by specific anti-epileptic drugs (AEDs) (Micheletti et al. 1985; Danober et al. 1998), we tested the effects of 2 of these compounds, ETHX and VPA, on the mixed cortical discharges in P25–P30 GAERS. Injection of ETHX in Stage 2 GAERS (200 mg/kg, i.p.; $n = 4$) induced a strong sedative effect that precluded any reliable quantification of cortical discharges (data not shown). Injection of VPA (200 mg/kg, i.p.; $n = 4$) had a less pronounced sedative effect and caused a significant decrease in the cumulated duration (data not shown) and number (Fig. 1E) of cortical discharges compared to saline injection (20 min post-injection, $P < 0.001$; 40 min post-injection, $P < 0.05$). The few cortical discharges that persisted 40 min after drug injection were composed of both oscillations and SW, suggesting that VPA affected both LFP patterns. Beyond 1 h post-injection, GAERS pups tended to fall asleep, leading to a decrease of cortical discharges number even after administration of saline. This non-specific change in the number of epileptic discharges likely results from the combined effect of long-duration recordings ($\geq 1\text{h}30$) and the young age of the animals as this was not observed in our previous pharmacological studies in adults (Deransart et al. 1999, 2000).

Altogether, these data suggest that the recurrent oscillatory activities that emerged in GAERS at P15 represent an early signature of AE as 1) they were not found in age-matched non-epileptic animals, 2) they progressively evolved into SWDs with age, 3) they were associated with behavioral arrest, and 4) they were suppressed by AEDs. These early cortical paroxysms may thus reflect the very first sign of the pro-ictogenic dysfunctions emerging in the SoCx neural network in GAERS.

Leading Role and Maturation of the Somatosensory Cortical Discharges During Epileptogenesis

To determine whether the SoCx exerts a leading role in the occurrence of cortical discharges during the first stages of GAERS epileptogenesis, we performed simultaneous LFP recordings in the SoCx and ipsilateral MoCx and measured the onset delay between the 2 cortical regions at the 3 stages. Regardless of the stage of epileptogenesis, cortical discharges were systematically detected first in the SoCx (Fig. 2A), with a progressive increase in the onset delay from Stage 1 to Stage 3 (Stage 1, Δt MoCx–SoCx = 0.45 ± 0.04 s; Stage 2, Δt MoCx–SoCx = 0.92 ± 0.12 s; Stage 3, Δt MoCx–SoCx = 1.1 ± 0.08 s, $n = 50$ cortical discharges/stage from $n \geq 4$ GAERS; $P < 0.01$) (Fig. 2B).

We further characterized the progressive maturation of oscillatory activities into SWDs by quantifying the number and mean duration of cortical discharges as a function of the developmental stage. During Stage 1, we found a gradual increase in the number of cortical discharges from P15 to P20 (P15, 1.3 ± 0.4 cortical discharges/h, $n = 8$ GAERS vs. P20, 13.8 ± 2.5 cortical discharges/h, $n = 11$ GAERS) together with an increase in their duration (P15, 2.2 ± 0.8 s, $n = 8$ GAERS vs. P20, 3.4 ± 0.2 s, $n = 11$ GAERS) (Fig. 2C,D). Similar increases in both number (P25, 46.0 ± 5.5 cortical discharges/h, $n = 8$ GAERS vs. P40, 71 ± 3.9 cortical discharges/h, $n = 4$ GAERS) and duration (P25, 5.1 ± 1.1 s, $n = 8$ GAERS vs. P40, 9.0 ± 0.3 s, $n = 4$ GAERS) of mixed cortical discharges occurred in the course of Stage 2 (Fig. 2C,D). While the number of discharges at the transition between Stage 2 and 3 still progressed, it rapidly reached a plateau as evidenced by the similar incidence of epileptiform activities at P60 and P90 (P60,

103.3 ± 9.2 cortical discharges/h, $n = 4$ GAERS vs. P90, 91.6 ± 6.1 cortical discharges/h, $n = 19$ GAERS, $P > 0.9$) (Fig. 2C). However, the duration of SWDs during Stage 3 continued to increase linearly, from 11.8 ± 2.2 s at P60 to 21.7 ± 1.8 s at P90 (Fig. 2D). Noticeably, the number of cortical discharges calculated at P60 and P90 was very close to that previously estimated in P120 GAERS (Pouyatos et al. 2013), suggesting a stabilization of the propensity of SoCx networks to generate seizures from the first part of Stage 3.

These results indicate a rapid progression of epileptogenic processes during the third and fourth post-natal weeks, followed by a period of relative stability. Stage 1 may thus be considered as a “latent” period, Stage 2 would represent the development of the epileptogenesis due to rapid and pronounced modifications in SoCx neurons and networks, and Stage 3 the maturity of the underlying pro-ictogenic processes.

Progressive Shaping of Absence Seizure Electrical Signature: From Oscillation to SW Complex

We further characterized the age-dependent changes in the morphology of cortical discharges by comparing the average LFP waveform between the different stages of epileptogenesis (Fig. 3A). During Stage 1, LFP activity was dominated by nearly symmetrical oscillations of relatively small amplitude (Fig. 3A, left). The negative part of these oscillations had a mean initial slope of -6.4 ± 0.5 mV/s, a half-duration of 69.4 ± 2.1 ms and a total duration of 84.9 ± 1.9 ms ($n = 19$ cortical discharges, $n = 4$ GAERS) (Fig. 3A, left and B). Marked changes arose during the transition from Stage 1 to Stage 2. Averaged unitary epileptiform pattern became more variable in shape and amplitude and a pronounced narrowing of the negative deflection was observed (Fig. 3A, middle). This was reflected by an increase in the negative slope (-19.8 ± 1 mV/s, $n = 29$ cortical discharges from 4 GAERS; $P < 0.001$) associated with a decrease in the half (28.6 ± 1.4 ms, $n = 29$ cortical discharges from 4 GAERS; $P < 0.001$) and total (56.2 ± 3.54 ms, $n = 29$ cortical discharges from 4 GAERS; $P < 0.01$) duration of the negative deflection (Fig. 3A, middle and B). On average, we observed a 3-fold increase of the negative slope value between Stages 1 and 2, together with a 2.4-fold and 1.5-fold decrease in its half-duration and total duration, respectively (Fig. 3B). During Stage 2, we noticed the sporadic occurrence of a small positive deflection following the negative component, which exhibited, however, a large variability in shape and duration (arrow in Fig. 3A, middle). At Stage 3, as typically observed in adult GAERS (Depaulis et al. 2016), averaged individual epileptiform pattern was relatively stereotyped and composed of a large and narrow negative spike followed by a positive wave lasting 50–70 ms (Fig. 3A, right). The duration of the negative deflection was considerably reduced compared to Stage 2 (half-duration = 17 ± 0.6 ms, total duration = 33 ± 1.5 ms, $n = 23$ cortical discharges, $n = 4$ GAERS; $P < 0.001$ and $P < 0.01$) whereas its negative slope was enhanced (-36 ± 1.6 mV/s, $n = 23$ cortical discharges, $n = 4$ GAERS; $P < 0.001$) (Fig. 3A,B). The average duration of the negative spike at Stage 3 was consistent with that previously measured in adult WAG/Rij rats (Sitnikova and van Luijckelaar 2007) and conforms the standard criteria of spike detection used by clinicians (Chatrian et al. 1974).

These findings demonstrate that epileptogenesis in GAERS is associated with a progressive tightening of the negative part of LFP waveforms coupled with the emergence of a subsequent positive wave, finally leading to a typical SW complex. Previous *in vivo* investigations from adult GAERS reported that the spike

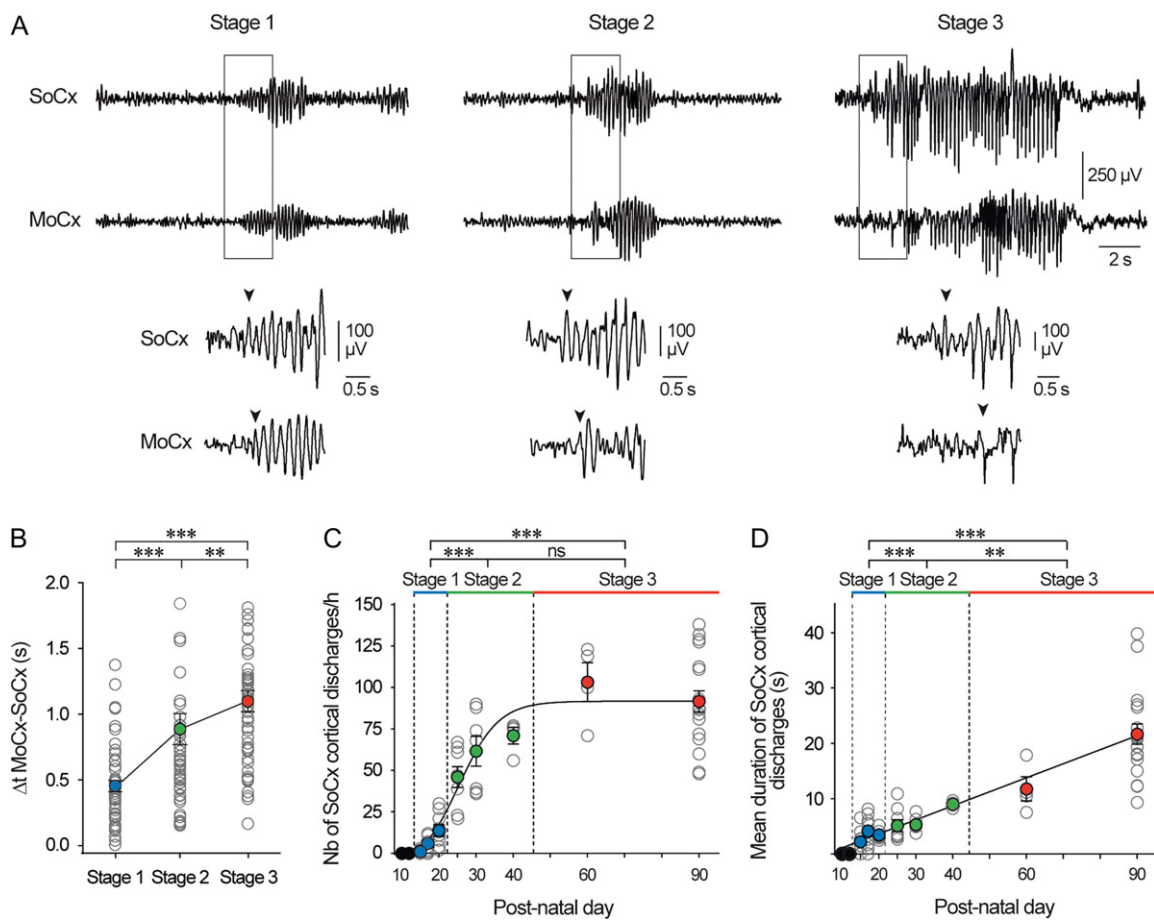


Figure 2. Age-dependent changes in cortical discharges properties. (A) Top, Typical simultaneous LFP recordings in the primary somatosensory cortex (SoCx) and motor cortex (MoCx) at the 3 stages of epileptogenesis. Bottom, Expansion of the paired LFP recordings (as indicated by the boxes) illustrating the early onset of cortical discharges in the somatosensory cortical region. The arrowheads indicate the beginning of the cortical discharges in the 2 cortical regions. (B) Quantification of the time delay (Δt) between the onset of cortical discharges in MoCx and SoCx ($n = 50$ cortical discharges/stage in $n \geq 4$ animals). (C,D) Number per hour (C) and mean duration (D) of cortical discharges as a function of age. The number of cortical discharges as a function of the post-natal day followed a sigmoidal function ($r^2 > 0.83$), whereas the temporal evolution of the mean duration was best fitted by a linear regression ($r^2 > 0.75$). Each open circle represents values obtained in individual animals and filled circles represent mean \pm s.e.m. Significance between stages was assessed using Kruskal–Wallis ANOVA on ranks with Dunn’s post hoc correction (time delay, number and mean duration of cortical discharges). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

component of the SW complex is associated with synaptic depolarization and brisk firing in cortical pyramidal neurons while neurons are hyperpolarized and silent during the wave component (Depaulis et al. 2016; see also Fig. 6A). The shaping of SW activity during the development of absence seizures may thus reflect the progressive establishment of synchronized oscillatory activities in SoCx synaptic networks.

Age-dependent Alterations in Background Activity and Intrinsic Excitability of GAERS Somatosensory Cortex Neurons

The post-natal transformation of oscillatory discharges into mature SWDs described from LFP recordings in freely moving GAERS could result from progressive functional alterations in SoCx neurons and networks, including changes in the excitability of individual neurons, the strength of network synaptic activity and/or the propensity of interconnected cortical neurons to generate synchronized oscillations. To explore these potential epileptogenic processes, we performed *in vivo* intracellular recordings of deep-layer pyramidal SoCx neurons, simultaneously with the corresponding surface ECoG, in GAERS

under sedation and analgesia at the 3 developmental stages, and in age-matched control Wistar rats (see Materials and Methods). We found that most of the pro-ictogenic properties of deep-layer SoCx pyramidal neurons, supposed to promote SW activity in adult GAERS (Polack et al. 2007, 2009; Chipaux et al. 2011; Williams et al. 2016), progressively developed during the post-natal period.

Regardless of the age period examined, background intracellular activity in between cortical discharges in GAERS (Fig. 4A1) and in control animals (Fig. 4A2) was characterized by a continuous barrage of intermingled high-frequency depolarizing and hyperpolarizing synaptic potentials that resulted in unimodal distributions of membrane potential (V_m) values (Fig. 4B1,B2, left). While the mean V_m of cortical neurons was stable across age in control animals ($P > 0.6$), we observed a gradual membrane depolarization during the post-natal period in GAERS. The mean level of membrane polarization at Stage 1 ($V_m = -64.4 \pm 0.6$ mV, $n = 12$ neurons from 5 rats), which was similar to that measured in age-matched control animals (Wistar P17, $V_m = -65.3 \pm 0.7$ mV, $n = 11$ neurons from 4 rats; $P > 0.3$), shifted to a more depolarized value during Stage 2 ($V_m = -62.3 \pm 0.8$ mV, $n = 10$ neurons from 5 rats; $P < 0.05$) and reached -59.4 ± 0.6 mV ($n = 11$ neurons from 8 rats)

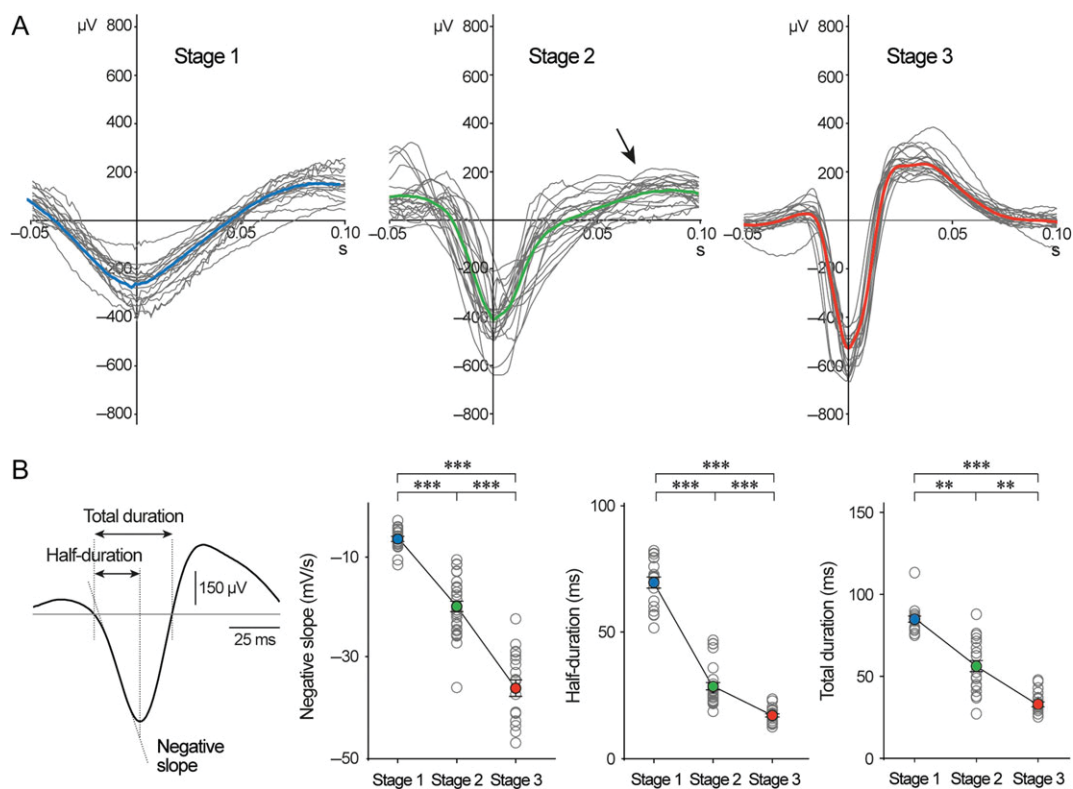


Figure 3. Progressive evolution of the unitary epileptiform pattern composing cortical discharges. (A) Averaged unitary epileptiform pattern composing cortical discharges recorded at Stages 1 (left), 2 (middle) and 3 (right). Note the progressive evolution of cortical oscillations (Stage 1) into typical spike-and-wave complexes (Stage 3). The arrow in Stage 2 indicates the sporadic occurrence of small-amplitude positive waves. (B) Properties of averaged unitary epileptiform patterns at the 3 stages. Three distinctive parameters were measured as illustrated on the representative record shown at left: the half-duration of the negative deflection, its total duration and slope (negative slope). Corresponding summary plots are shown at right. Each open circle represents the average unitary epileptiform pattern of 1 cortical discharge ($n \geq 19$ from $n \geq 4$ animals) and filled circles represent mean \pm s.e.m. Significance between stages was assessed using Kruskal-Wallis ANOVA on ranks with Dunn's post hoc correction. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

at Stage 3 ($P < 0.001$ vs. Stage 1 and $P < 0.01$ vs. Stage 2) (Fig. 4A,B). Despite the relative membrane hyperpolarization of cortical neurons in younger GAERS, which could have amplified the amplitude of depolarizing synaptic potentials via an increase in the driving force of synaptic currents, the amplitude of spontaneous V_m fluctuations at Stage 1 (V_m SD = 1.8 ± 0.2 mV, $n = 12$ neurons from 5 rats) were significantly smaller than that measured at Stage 2 (V_m SD = 2.3 ± 0.1 mV, $n = 10$ neurons from 5 rats; $P < 0.05$) and in adult GAERS (V_m SD = 2.9 ± 0.2 mV, $n = 11$ neurons from 8 rats; $P < 0.001$ vs. Stage 1 and $P < 0.05$ vs. Stage 2) (Fig. 4A1). The increase in spontaneous V_m fluctuations could result from a progressive enhancement of the ongoing synaptic drive and/or an increase in neuronal membrane input resistance (R_m) and time constant (τ_m) during cortical maturation in GAERS. An increase in the resting membrane excitability could be eliminated. Indeed, averaged values of R_m (Stage 1, $R_m = 24.8 \pm 2.0$ M Ω , $n = 12$ neurons from 5 rats; Stage 2, $R_m = 24.2 \pm 2.3$ M Ω , $n = 10$ neurons from 5 rats; Stage 3, $R_m = 21.5 \pm 2.5$ M Ω , $n = 11$ neurons from 8 rats; $P > 0.5$) and τ_m (Stage 1, $\tau_m = 9.5 \pm 1.1$ ms, $n = 11$ neurons from 5 rats; Stage 2, $\tau_m = 7.4 \pm 1.0$ ms, $n = 10$ neurons from 5 rats; Stage 3, $\tau_m = 8.7 \pm 1.0$ ms, $n = 11$ neurons from 8 rats; $P > 0.3$) were similar at the different developmental stages and did not differ from R_m and τ_m values measured in control neurons ($P > 0.2$ for both parameters) (Fig. 5A, lowest records and C).

The age-dependent depolarizing shift in GAERS neurons was associated with a significant increase in the spontaneous firing frequency from Stage 1 (0.2 ± 0.1 Hz, $n = 11$ neurons from

5 rats) to Stage 2 (2.0 ± 0.8 Hz, $n = 10$ neurons from 5 rats; $P < 0.05$). The rise in firing rate was also important between Stages 2 and 3 (15.5 ± 2.3 Hz, $n = 11$ neurons from 8 rats; $P < 0.001$) with, however, a high cell-to-cell variability at adult age (Fig. 4A1,B1). Consistent with the lack of changes in the mean V_m or R_m values of control neurons during post-natal development, their spontaneous firing was found similar in the different age groups (Wistar P17, 2.3 ± 0.9 Hz, $n = 11$ neurons from 4 rats; Wistar P30, 2.2 ± 1.4 Hz, $n = 6$ neurons from 4 rats; Wistar $P \geq 90$, 2.9 ± 1.0 Hz, $n = 10$ neurons from 10 rats; $P > 0.6$) (Fig. 4B2). The firing rate in Stage 1 GAERS was too low (< 0.5 Hz) to allow a reliable quantification of its regularity. However, we found that the CV2 of ISIs at Stage 2 (1.0 ± 0.1 , $n = 5$ neurons from 3 rats) was higher than that calculated in adult GAERS (0.72 ± 0.02 , $n = 10$ neurons from 7 rats; $P < 0.01$) and comparable to that of control neurons ($P > 0.1$) (Fig. 4B1,B2). The enhanced firing frequency of adult GAERS neurons was associated with a shorter AP half-width (Stage 1, 1.07 ± 0.09 ms, $n = 12$ neurons from 5 rats; Stage 3, 0.57 ± 0.02 ms, $n = 11$ neurons from 8 rats; $P < 0.001$) and a lower voltage firing threshold (Stage 1, -48.7 ± 1.1 mV, $n = 11$ neurons from 5 rats; Stage 3, -52.4 ± 0.8 mV, $n = 11$ neurons from 8 rats; $P < 0.01$).

These results indicate that epileptogenesis in GAERS is associated with an increase in the rate and rhythmicity of spontaneous firing in SoCx deep-layer neurons, a phenomenon that was not observed in control Wistar rats. In line with these observations, most of GAERS cortical neurons at Stage 3 ($n = 6$ out of 11)

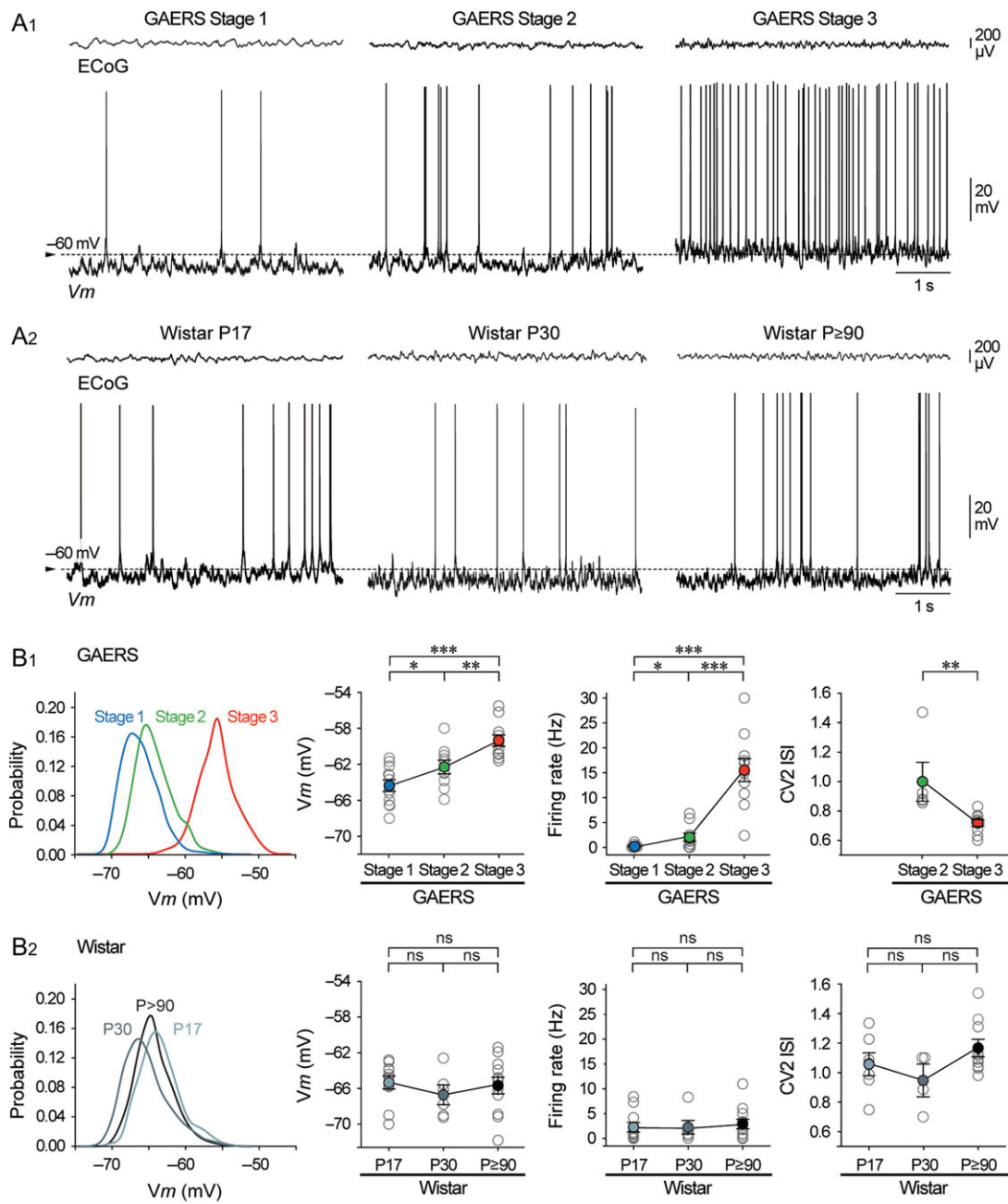


Figure 4. Age-dependent changes in membrane potential and spontaneous firing of GAERS somatosensory cortex neurons. (A) Electroencephalographic (ECoG) activity (top traces) and corresponding intracellular recordings (V_m , bottom traces) obtained, in between cortical discharges, from layer 5 somatosensory cortex pyramidal neurons of GAERS at Stages 1, 2, and 3 (A1), and in age-matched (P17, P30, and $P \geq 90$) control Wistar rats (A2). Dashed lines indicate -60 mV. (B1) Left, V_m distribution histograms (1 mV bin) computed from the cells illustrated in (A1). Right, population data showing that the post-natal development of GAERS neurons is associated with a progressive depolarization of their mean V_m (Stage 1, $n = 12$ neurons; Stage 2, $n = 10$ neurons; Stage 3, $n = 11$ neurons), an increase in their spontaneous firing rate (Stage 1, $n = 11$ neurons; Stage 2, $n = 10$ neurons; Stage 3, $n = 11$ neurons) and in the regularity of AP discharge (CV2 ISI; Stage 2, $n = 5$ neurons; Stage 3, $n = 10$ neurons). (B2) Left, V_m distribution histograms (1 mV bin) computed from the cells illustrated in (A2). Right, population data comparing the mean V_m (P17, $n = 11$ neurons; P30, $n = 6$ neurons; $P \geq 90$, $n = 12$ neurons), the spontaneous firing rate (P17, $n = 11$ neurons; P30, $n = 6$ neurons; $P \geq 90$, $n = 12$ neurons) and the firing regularity (CV2 ISI; P17, $n = 7$ neurons; P30, $n = 4$ neurons; $P \geq 90$, $n = 10$ neurons) across the different groups of control Wistar rats. Here and in similar population graphs, each open circle represents an individual neuron and filled circles represent the corresponding mean value \pm s.e.m. Significance was assessed using ANOVA (V_m and CV2 ISI) or Kruskal–Wallis ANOVA on ranks (firing rate). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

could generate intrinsic bursts of APs in response to depolarizing current pulses (Fig. 5A1, right), whereas this intrinsic firing profile was absent during Stages 1 and 2 (Fig. 5A1, left).

We next examined whether these age-dependent cellular changes were associated with modifications in the transfer function of cortical neurons, which describes the relation

between excitatory inputs of varying amplitude and neuronal output defined as AP generation (Silver 2010). We thus generated F–I relationships in GAERS neurons from Stage 1 ($n = 9$ neurons from 5 rats) and Stage 3 ($n = 6$ neurons from 5 rats), the 2 extremes stages of epileptogenesis, and in age-matched control Wistar rats (Wistar P17, $n = 10$ neurons from 4 rats;

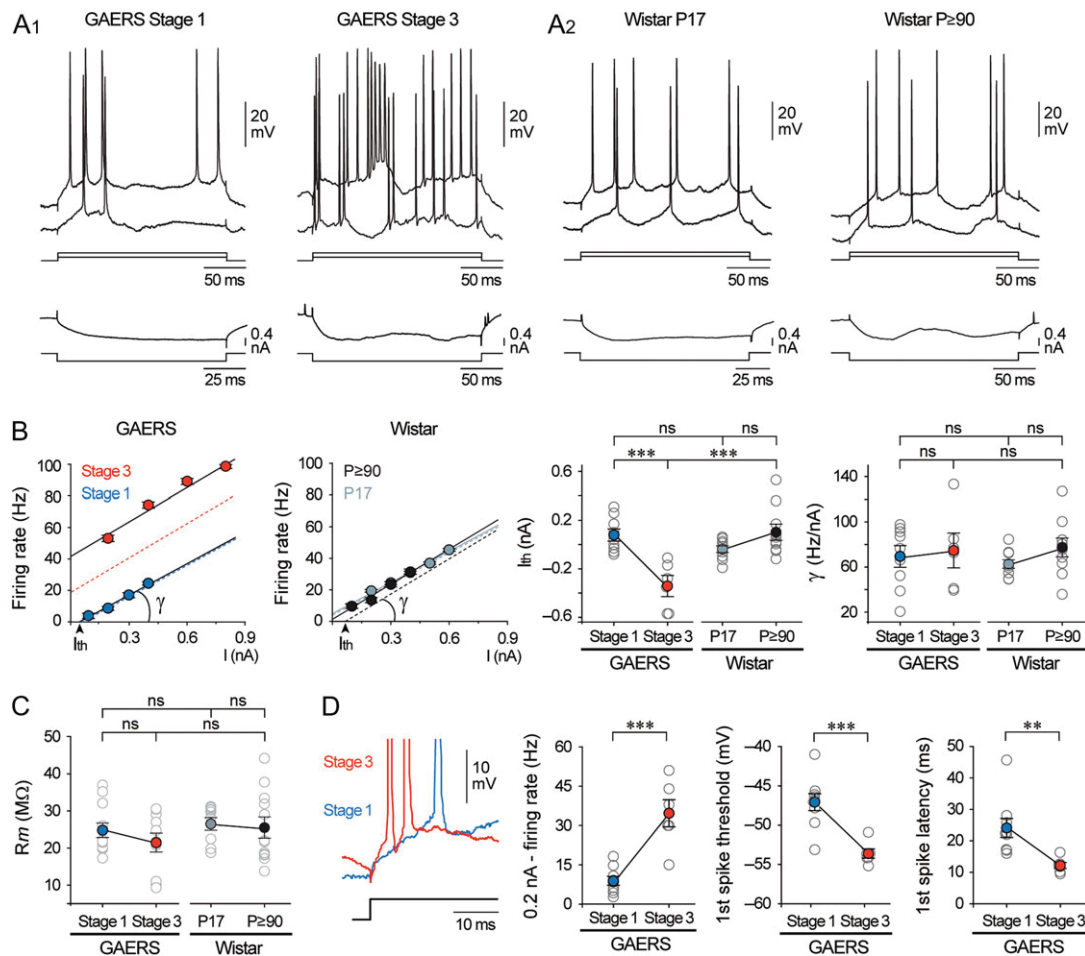


Figure 5. Developmental changes in membrane excitability and transfer function of GAERS cortical neurons. (A) Typical voltage responses of deep-layer somatosensory cortical neurons (top records), recorded during Stage 1 and Stage 3 in GAERS (A1) and in age-matched control Wistar rats (A2), to injection of depolarizing (+0.2 and +0.4 nA) and hyperpolarizing (−0.4 nA) current pulses (bottom traces). The responses induced by the negative current pulses were averaged from at least 10 successive trials. (B) Left, Corresponding F–I curves computed from the neurons shown in (A1) (blue circles, Stage 1; red circles, Stage 3) and (A2) (light gray circles, P17; black circles, $P \geq 90$). The dashed lines represent the best linear fits after subtraction of the baseline firing rates. Right, Summary plot comparing the intensity of threshold current (I_{th}) and neuronal gain (γ) values across the different experimental groups. (GAERS Stage 1, $n = 9$; GAERS Stage 3, $n = 6$; Wistar P17, $n = 10$; Wistar $P \geq 90$, $n = 10$). (C) Population data showing the constancy of R_m values in the 2 rat strains. (GAERS Stage 1, $n = 12$; GAERS Stage 3, $n = 11$; Wistar P17, $n = 11$; Wistar $P \geq 90$, $n = 12$). (D) The increased firing rate in response to current pulses of +0.2 nA in GAERS cortical neurons at Stage 3 (left) was associated with a decrease in the first spike voltage threshold (middle) and first spike latency (right). Pooled data depicted in (D) are from 9 neurons recorded at Stage 1 and 6 neurons recorded at Stage 3. Significance was assessed using ANOVA (B–C) or unpaired t-test (D). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

Wistar $P \geq 90$, $n = 10$ neurons from 8 rats) (Fig. 5A1,A2,B). The extrapolated values of threshold current (I_{th}) calculated at Stage 1 in GAERS ($I_{th} = 0.08 \pm 0.05$ nA, $n = 9$ neurons), were similar to those measured in control neurons from P17 and adult animals (Wistar P17, $I_{th} = -0.04 \pm 0.03$ nA, $n = 10$ neurons; Wistar $P \geq 90$, $I_{th} = 0.10 \pm 0.07$ nA, $n = 10$ neurons; $P > 0.1$), but significantly dropped in older GAERS ($I_{th} = -0.34 \pm 0.09$ nA, $n = 6$ neurons; $P < 0.001$) (Fig. 5B). The lower firing threshold in Stage 3 GAERS neurons was likely influenced by their high background firing frequency. However, even after subtracting the background firing rate from F–I curves (dashed lines in Fig. 5B, left), the current-evoked firing threshold at Stage 3 remained lower than that calculated during Stage 1 (Stage 1, $I_{th} = 0.08 \pm 0.05$ nA, $n = 9$ neurons; $I_{th} = -0.10 \pm 0.06$ nA, $n = 6$ neurons; $P < 0.05$). This leftward sliding of F–I relation with age in GAERS was accompanied by a strong increase of firing responses to weak inputs (+0.2 nA) (Stage 1, 8.9 ± 1.8 Hz, $n = 9$ neurons vs. Stage 3,

34.7 ± 5.6 Hz, $n = 6$ neurons; $P < 0.001$), a lowering in the voltage threshold for the first AP (Stage 1, -47.1 ± 1.1 mV, $n = 9$ neurons vs. Stage 3, -53.6 ± 0.6 mV, $n = 6$ neurons; $P < 0.001$) and a reduction of its latency (Stage 1, 24.1 ± 3.2 ms, $n = 6$ neurons vs. Stage 3, 12.1 ± 1.1 ms, $n = 6$ neurons; $P < 0.01$) (Fig. 5D). Consistent with the stability of R_m values across the different experimental groups (Fig. 5C), the functional gain of GAERS neurons, measured as the slope (γ) of F–I curves, was not affected between Stage 1 and Stage 3 (Stage 1, $\gamma = 69.4 \pm 9.6$ Hz.nA $^{-1}$, $n = 9$ neurons; Stage 3, $\gamma = 74.7 \pm 15.4$ Hz.nA $^{-1}$, $n = 6$ neurons; $P > 0.7$) and was similar to that of control neurons (Wistar P17, $\gamma = 62.7 \pm 3.7$ Hz.nA $^{-1}$, $n = 10$ neurons; Wistar $P \geq 90$, $\gamma = 77.3 \pm 8.3$ Hz.nA $^{-1}$, $n = 10$ neurons; $P > 0.5$) (Fig. 5B). These findings demonstrate that the sensitivity to weak inputs of SoCx deep-layer neurons in GAERS increases with age but that the dynamic change of their responsiveness over a wide range of inputs is not affected.

Neuronal Correlates of Developing Epileptiform Activities

To unveil the neuronal mechanisms underlying the progressive maturation of epileptiform activity, from 5-Hz oscillatory discharges to 7–8 Hz SWDs, and the sharpening of unitary epileptiform pattern (Fig. 3), we examined the intracellular activities of

SoCx deep-layer neurons during the cortical discharges at the 3 developmental stages.

At the occurrence of oscillatory discharges (Stage 1), mixed discharges (Stage 2), and SWDs (Stage 3), the disorganized membrane potential fluctuations in pyramidal cortical neurons were replaced by clusters of rhythmic depolarizing synaptic potentials (Fig. 6A, left). At Stages 1 and 2, the individual

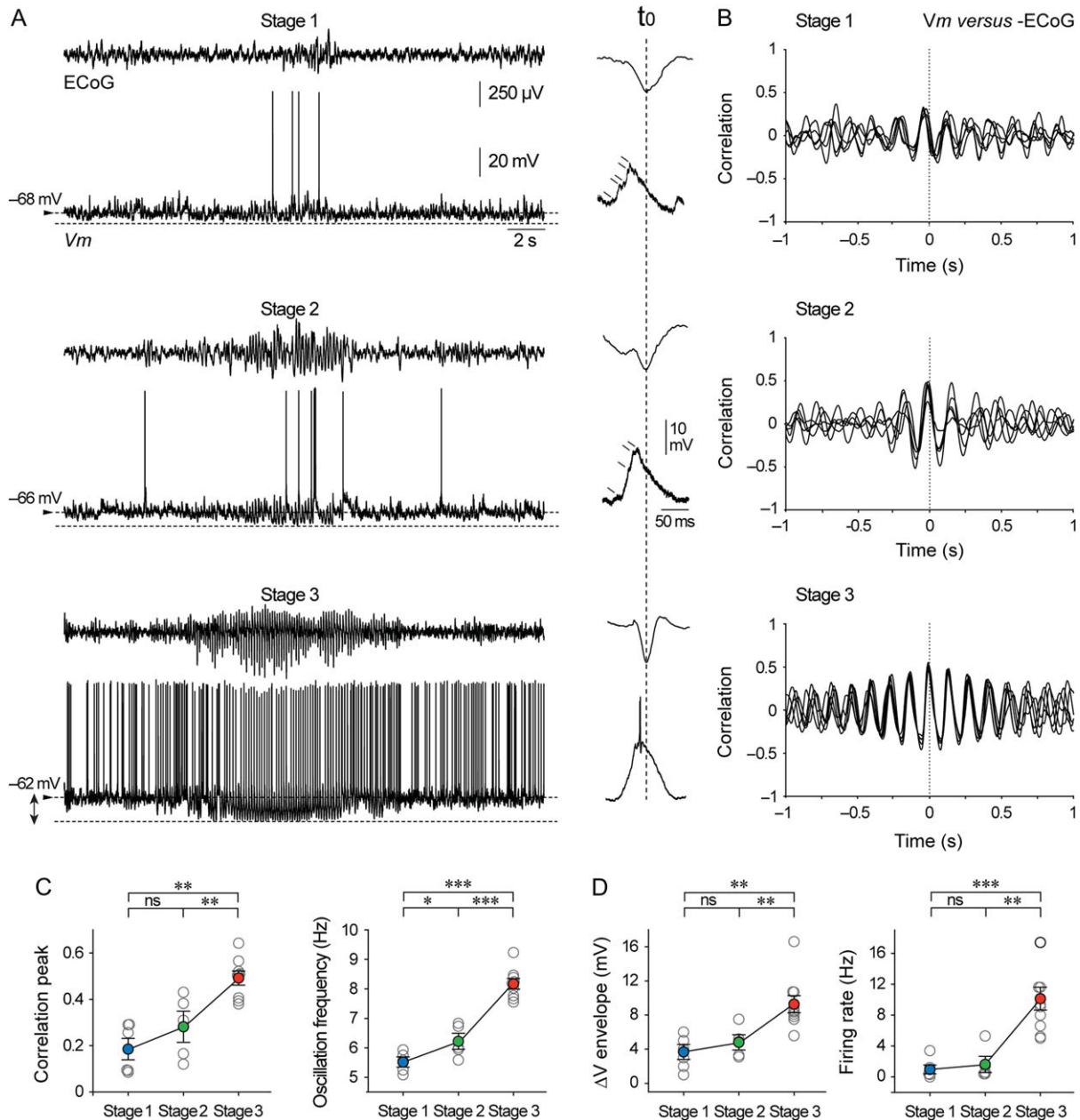


Figure 6. Intracellular correlates of the developing paroxysmal oscillations in the GAERS somatosensory cortex. (A) Simultaneous ECoG and intracellular recordings from deep-layer somatosensory cortical neurons at Stages 1, 2, and 3, during periods of synchronized oscillations in the ECoG. As shown by the horizontal dashed lines, cortical neurons displayed a membrane hyperpolarization at the occurrence of surface oscillations compared to the corresponding baseline V_m (arrowheads). The right column shows an expanded view of an intracellular membrane oscillation (bottom records) at the 3 stages, together with the corresponding ECoG wave (top records). These fragments of paired records are aligned using the peak negativity of the ECoG wave (vertical dashed line) as the time reference (t_0). (B) Superimposition of cross-correlograms ($n = 5$, oscillatory periods of 2–4 s duration) calculated during the 3 stages between the intracellular activity (V_m) and the corresponding inverted oscillatory ECoG signal (-ECoG), using V_m as the reference. (C) Correlation analyses indicate a significant increase in the correlation peak values and in the frequency of surface oscillations from Stage 1 to Stage 3. (D) Summary data showing the post-natal evolution of the neuronal hyperpolarizing envelope (left, as indicated by the double arrow in (A)) and the mean firing rate (right) associated with the synchronized oscillations. Pooled data in (C) and (D) are from: Stage 1, $n = 6$ neurons; Stage 2, $n = 5$ neurons; Stage 3, $n = 9$ neurons. Significance was assessed using unpaired t -test (oscillation frequency and ΔV envelope) or Mann-Whitney rank sum test (correlation peak and firing rate). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

intracellular events, concomitant with the EcoG waveforms, were sculpted by the temporal summation of small depolarizing synaptic potentials (Fig. 6A, right). They increased in amplitude and reduced in duration with age, leading to relatively smooth and large (15–20 mV) synaptic depolarizations in the adult GAERS (Fig. 6A, Stage 3 in the right column). This suggests a progressive reinforcement of synaptic synchronization within SoCx networks during epileptogenesis, in agreement with the age-dependent tightening and increase in amplitude of the LFP/ECoG components (Figs 4 and 6A, right). An increasing coherence in the collective activity of cortical neurons is further supported by the enhancement of the correlation level (Fig. 6B, C, left) and the decrease in the time delay (Stage 1, -34.1 ± 3.8 , $n = 6$ neurons from 3 rats; Stage 2, -24.5 ± 6.7 , $n = 5$ neurons from 4 rats; Stage 3, -13.9 ± 2.4 , $n = 9$ neurons from 6 rats; $P < 0.01$ vs. Stage 1, $P = 0.06$ vs. Stage 2) between intracellular and ECoG oscillatory waveforms (Fig. 6A right and B), which paralleled the increase in the internal frequency of cortical oscillations with age (Figs 1B and 6C, right).

The age-dependent increase in the amplitude of rhythmic synaptic depolarizations led to a progressive enhancement of the neuronal firing rate during cortical discharges. Indeed, the mean firing rate during SWDs at Stage 3 (10.1 ± 1.5 Hz, $n = 230$ SWDs from 10 neurons) was significantly higher than during oscillatory discharges at Stage 1 (1.0 ± 0.6 Hz, $n = 225$ oscillatory discharges from 6 neurons; $P < 0.001$) and mixed discharges at Stage 2 (1.6 ± 1.0 Hz, $n = 280$ mixed discharges from 5 neurons; $P < 0.01$) (Fig. 6A,D, right). As previously described (Charpier et al. 1999; Polack et al. 2007; Williams et al. 2016), ictal intracellular oscillations in adult GAERS were superimposed on a tonic membrane hyperpolarization that was maintained throughout the SWD and had an amplitude of 9.3 ± 1.0 mV ($n = 230$ SWDs from 10 neurons) (Fig. 6A, lowest record and D, left). This sustained polarization of neurons was significantly smaller during the early stages (Stage 1, 3.7 ± 0.9 mV, $n = 225$ oscillatory discharges from 5 neurons; Stage 2, 4.8 ± 0.9 mV, $n = 280$ mixed discharges from 5 neurons; $P < 0.01$ compared to Stage 3) (Fig. 6A,D, left). The maximal level of membrane polarization reached during cortical oscillations, which was similar at the 3 stages (Stage 1, -67.0 ± 1.7 mV, $n = 225$ oscillatory discharges from 5 neurons; Stage 2, -69.0 ± 1.5 mV, $n = 280$ mixed discharges from 5 neurons; Stage 3, -69.4 ± 0.8 mV, $n = 230$ SWDs from 10 neurons; $P > 0.4$), was significantly lower compared to the corresponding baseline V_m (arrowheads in Fig. 6A) ($P < 0.05$ for each paired comparison). This finding is consistent with our initial hypothesis that the sustained hyperpolarization of GAERS neurons during SWDs probably results from a process of synaptic disfacilitation, that is, a transient interruption in the ongoing synaptic drive, setting passively the cell to its resting potential (Charpier et al. 1999; Depaulis et al. 2016).

Altogether, our findings indicate that the post-natal maturation of cortical epileptic activities in the GAERS is correlated with a progressive increase in the magnitude and level of synchronization of neuronal oscillations in the deep layers of the SoCx.

Effect of Chronic Treatments with Anti-epileptic Drugs Before SWDs Onset

Based on our results showing a progressive evolution of epileptic cortical discharges during the post-natal period, associated with age-dependent changes in the electrophysiological features of SoCx neurons and networks, we hypothesized that a chronic

anti-epileptic treatment throughout the period preceding the occurrence of SWDs could alter the evolution of the disease.

GAERS pups were injected daily from P5 to P25 with saline or first-choice AEDs (i.e., ETHX or VPA), at doses known to suppress SWDs in adult GAERS (200 mg/kg/day, i.p.; Micheletti et al. 1985). Changes in the properties of cortical discharges were assessed from P35 to P90 using long-term monitoring of LFP activity (Fig. 7A). At P35, cortical discharges were still observed in the 3 groups and their number (Saline, 78.7 ± 7.8 cortical discharges/h; VPA, 65.1 ± 15.5 cortical discharges/h, $P = 0.43$ vs. Saline; ETHX: 102.7 ± 11.6 cortical discharges/h, $P > 0.30$ vs. Saline, $P > 0.08$ vs. VPA) as well as their cumulated duration (Saline, 474.9 ± 69.2 s/h; VPA, 416.7 ± 77.1 s/h, $P = 0.73$ vs. Saline; ETHX: 610.1 ± 57.1 s/h, $P > 0.64$ vs. Saline, $P > 0.58$ vs. VPA) were similar (Fig. 7B,C). This lack of changes in the properties of cortical discharges between the different cohorts persisted until P90, although animals treated with ETHX showed a tendency to display more numerous and longer epileptic activities (Fig. 7B,C). In addition, we found that the composition of cortical discharges (proportion of oscillation vs. SW) was also not affected by the pharmacological procedures (data not shown).

Seven weeks after the end of the chronic anti-epileptic treatment, pre-treated animals from the 3 groups were challenged with acute injections of low and high concentrations of ETHX (25 and 200 mg/kg) or VPA (75 and 200 mg/kg). The effects of drug injections on the amount of SWDs were compared with injections of saline, applied in a counter-balanced order (see Materials and Methods). Regardless of the experimental group, the number of cortical discharges was decreased by 2-fold following the injection of ETHX at low concentration and completely suppressed after administration of larger doses (Fig. 7D). A similar dose-dependent decrease was obtained after VPA injection, with a slight diminution and a quasi-suppression of cortical discharges for low and large drug concentrations, respectively (Fig. 7E). This dose-dependent attenuation of SWDs was analogous to that previously reported in adult GAERS that did not undergo the chronic drug treatment (Micheletti et al. 1985).

Our results indicate that an early treatment with ETHX or VPA does not alter the occurrence of SWDs or the efficiency of AEDs in adult GAERS.

Discussion

To our knowledge, the present study provides the first in vivo description of the developmental alterations occurring in cortical networks and neurons during GEs' epileptogenesis. In a well-established animal model of AE, we found that epileptiform activity progressively developed in the SoCx, from 5-Hz oscillatory discharges at the beginning of the third post-natal week to 7–8 Hz SWDs in adults. This was accompanied by an increase in the number and duration of cortical discharges and by a progressive sharpening of the individual cortical epileptiform event composing the discharges. Intracellular recordings of SoCx deep-layer pyramidal neurons demonstrated that maturation of cortical discharges in GAERS was accompanied by a progressive increase in the intrinsic excitability of cortical neurons, a strengthening of the local synaptic activity and an enhanced ability of cortical networks to generate synchronized oscillations. Finally, while acute injections of AEDs were found to be effective in reducing the number of both immature and mature cortical discharges, a chronic anti-epileptic treatment prior to seizures onset failed to prevent the development of the disease.

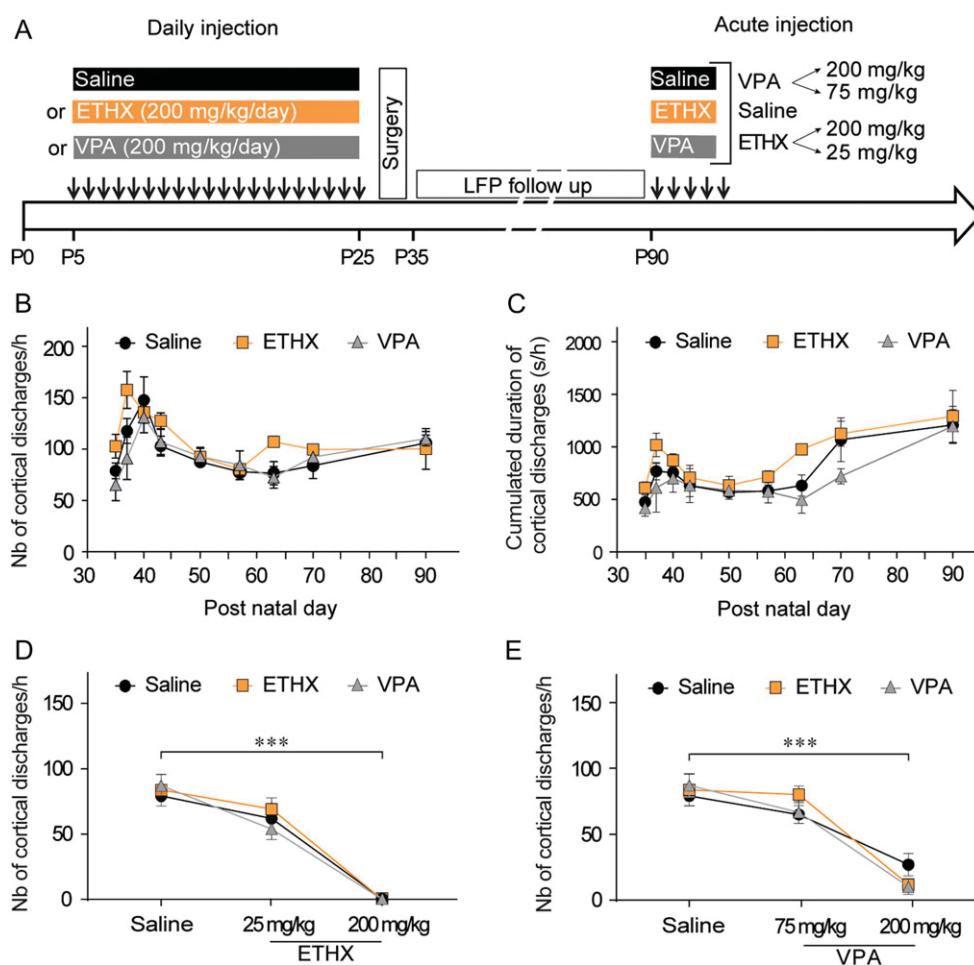


Figure 7. Chronic treatment with anti-absence drugs during the early phase of epileptogenesis in GAERS pups does not alter SWDs. (A) Schematic representation of the experimental design for chronic and acute treatments with AEDs. From P5 to P25, GAERS pups were treated with either valproate (VPA group, 200 mg/kg/day, $n = 7$), ethosuximide (ETHX group, 200 mg/kg/day, $n = 7$) or saline (Saline group, $n = 7$). At P32–33, animals were implanted with intra-cortical electrodes for a long-term LFP follow-up of cortical discharges activity. At P90, all animals were challenged with acute injections of VPA (75 and 200 mg/kg), ETHX (25 and 200 mg/kg) and Saline in a counter-balanced order to assess putative changes in their sensitivity to these drugs at adulthood. (B–C) Number (B) and cumulated duration (C) of cortical discharges per hour as a function of age, after chronic treatment with Saline, ETHX or VPA. (D,E) Impact of acute injection of ETHX (D) or VPA (E) on the number of cortical discharges recorded from P90 GAERS chronically pre-treated with Saline, VPA or ETHX. Significance was assessed using 2-way ANOVA with Bonferroni's post hoc correction. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

Evolution of Cortical Discharges During Post-natal Brain Maturation in GAERS

Our findings obtained from freely moving animals show that the early oscillatory discharges that emerge in the GAERS SoCx around P15 progressively evolve into SWDs with age. Based on cortical discharges properties, we propose that the development of epileptic activity in GAERS follows 3 different stages of maturation. At first stage, between P15 and P22, cortical discharges were of short duration and relatively rare. They were exclusively composed of rhythmic, nearly symmetrical, oscillations with a fundamental frequency around 5 Hz. During Stage 2, between P25 and P40, epileptiform discharges were composed of both oscillations and mixed events closely resembling SW complexes, and their number (45–70/h) and duration (5–9 s) increased. After P40, maturation processes reached an ultimate stage where cortical discharges contained a majority of SW and occurred ~90 times per hour. Remarkably, the internal frequency of mature cortical discharges was shifted towards the typical frequency range (around 7–8 Hz) of SWDs in adult GAERS (Danober et al. 1998;

Depaulis et al. 2016). They had longer duration (10–25 s) and exhibited an increased rhythmicity as evidenced by the appearance of second and third harmonics in power spectra. Our data further suggest that the 5-Hz oscillatory cortical discharges observed during the third and the fourth post-natal weeks represent an early signature of AE. Indeed, such cortical activities, which could not be detected in age-matched control animals, correlated with a behavioral arrest and were suppressed by VPA, an AED classically used in the clinic to suppress absence seizures. Interestingly, the presence of immature, transitional and mature epileptic discharges has also been reported in a mouse model of familial childhood epilepsy, the $GABA_A \gamma 2$ (R43Q) mutant mice (Tan et al. 2007) as well as in C3H/HeJ mice, another genetic model of AE (Ellens et al. 2009). Although the emergence of immature SWDs occurred earlier in C3H/HeJ compared to GAERS, similar age-dependent changes in the number, duration and morphology of cortical discharges were observed (Carçak et al. 2008; Ellens et al. 2009). In the WAG/Rij rat model, SWDs also evolve with age although the onset of seizures occurs at adulthood,

around 2–3 months after birth (Coenen and van Luijckelaar 1987; Kole et al. 2007)

Noticeably, we found that epileptic discharges start to appear in GAERS just after the end of the second post-natal week ($\geq P15$), which corresponds to a key period of SoCx maturation in normal rats. During the early post-natal period, neocortical sensory networks generate successively different types of highly coherent activities (early network oscillations, spindle bursts, gamma bursts, giant depolarizing potentials) (Adelsberger et al. 2005; Allene et al. 2008; Yang et al. 2009; Minlebaev et al. 2011 for review see Luhmann et al. 2016) that are replaced by more sparse and less correlated firing patterns at the end of the second post-natal week (Golshani et al. 2009; Rochefort et al. 2009). These early synchronous network activities, which are associated with a number of structural changes such as axonal growth, increase in the complexity of dendrites and in the number of synapses (Bureau et al. 2004; Feldmeyer 2012; for review see Luhmann et al. 2016 and Hanganu-Opatz 2010), are known to be critical for the refinement of circuits and the establishment of sensory cortical maps (Mitrukhina et al. 2015). Thus, it seems likely that subtle alterations in these fundamental maturation processes may lead to dysrhythmic activities such as epileptic discharges.

Our multisite LFP recordings from the primary somatosensory and motor cortical regions indicate that cortical discharges first appeared in the SoCx even at the first stage of epileptogenesis, supporting the critical role of the SoCx in the initiation of cortical discharges. The reasons for the age-dependent increase in the propagation delay between both cortices remain unclear. It could reflect maturation of the sensorimotor circuits, including an extension of brain size that would increase the distance of propagation and/or a synaptic refinement. Moreover, the flow of epileptic discharges within the cortico-thalamo-cortical networks has been shown to follow complex spatiotemporal dynamics in rodent models of AE (Meeren et al. 2002; Polack et al. 2009). It is thus plausible that the maturation of epileptic networks be associated with alternate changes in the directionality of propagated activities between intra-cortical and long-range thalamo-cortical loops, a dynamic process that could extend the delay of activation between SoCx and MoCx.

Cellular and Synaptic Changes in the GAERS Somatosensory Cortex During Epileptogenesis

Our combined intracellular and ECoG recordings in GAERS and control Wistar rats have established that deep-layer neurons of the GAERS SoCx display distinctive post-natal changes in their electrophysiological properties that parallel the maturation of cortical discharges. The absolute value of their V_m was gradually reduced, reaching a mean value at adulthood significantly more depolarized compared to homologous neurons in control rats. These results extend our previous findings showing that the depolarized V_m of GAERS neurons in adult animals was specific to the SoCx and to the layers 5–6 of this cortical region (Polack et al. 2007, 2009; Polack and Charpier 2009; Williams et al. 2016). The different maturation profile of resting membrane properties in epileptic and control neurons is further supported by former *in vitro* studies describing either a progressive membrane hyperpolarization (Kriegstein et al. 1987; Zhu 2000; Frick et al. 2007) or nearly unchanged V_m values (Franceschetti et al. 1998; Stern et al. 2001) in SoCx pyramidal neurons of normal rats during post-natal development. Altogether, these results suggest that the age-dependent depolarization of GAERS SoCx neurons is a specific feature of

absence epileptogenesis. The progressive change in V_m and the associated increase in the spontaneous firing could originate from alteration in the density of voltage-gated ion channels and/or an increase of the depolarizing synaptic drive. Consistently, mRNA and protein expression of sodium channel genes *Nav1.1* and *Nav1.6* is up-regulated selectively within pyramidal neurons in the SoCx of WAG/Rij rats and follows the age-dependent increase in seizures number and duration (Klein et al. 2004). An overexpression of sodium channels could be responsible, at least in part, for the age-dependent increase in tonic and bursting firing activities of SoCx deep-layer neurons. The enhanced propensity of cortical neurons to generate burst firing at adulthood (present study; Polack et al. 2007) could also be promoted by an age-dependent reduction of the hyperpolarization-activated cationic current I_h , like in WAG/Rij rats (Strauss et al. 2004; Kole et al. 2007).

The depolarization of SoCx deep-layer neurons was accompanied by a gradual increase in V_m fluctuations, suggesting a strengthening of the network synaptic activity. This could be caused by the rapid development of neocortical networks during the first weeks of life, including an increased synaptic connectivity between pyramidal neurons and a refinement of sensory maps, which results in an amplification of sensory-evoked depolarizing synaptic responses (Micheva and Beaulieu 1996; Stern et al. 2001; Bureau et al. 2004; Feldmeyer et al. 2013). The physiological development of SoCx networks could operate in synergy with pro-epileptogenic alterations in local synaptic transmission. As observed in WAG/Rij rats, an alteration in glutamatergic NMDA, AMPA or mGlu receptor-dependent synaptic transmission (van de Bovenkamp-Janssen et al. 2006; Ngomba et al. 2005; D'Amore et al. 2013; Russo et al. 2016) could further facilitate the development of paroxysmal activities within the SoCx. Such changes remain to be confirmed in GAERS.

Pyramidal neurons from the GAERS SoCx also exhibited developmental intrinsic changes that may promote synchronized collective oscillations and participate to the progressive transformation of relatively slow cortical oscillations into SW activity. The comparison of F-I relations between epileptic and control neurons during post-natal development indicates that absence epileptogenesis is associated with a marked reduction in the minimal stimulus intensity required to induce firing in cortical neurons, a lowering of the voltage threshold for evoked APs and a shortening of their latency. This cortical hyperexcitability could result from the steady depolarization of neurons with age (Altwegg-Boussac et al. 2014) or from a reduction in dendritic I_h (Strauss et al. 2004; Kole et al. 2007). This should facilitate the synaptic excitation of cortical neurons embedded in an over-activated network and increase the reliability and temporal coherence of firing, as expected for ictogenic activity. Finally, changes in the pro-ictogenic properties of SoCx networks are likely influenced by developmental alterations in the synaptic interactions within thalamic circuits (Bessaih et al. 2006; Tóth et al. 2007) or by the basal ganglia system, known to play a major role in controlling the expression of absence seizures (Deransart and Depaulis 2002; Paz et al. 2007).

Lack of Changes in SWDs After Early Chronic Treatment with Anti-absence Drugs

The finding of a critical period during which immature oscillatory discharges evolve into SWDs led us to hypothesize that AEDs treatment during this temporal window could perturb the epileptogenic processes and prevent the development of recurrent generalized seizures. However, our chronic treatment with either VPA or ETHX between P5 and P25 remained ineffective in

altering the number, the mean and cumulated duration as well as the EEG profile of cortical discharges from the 10th to the 80th day after the cessation of the treatment. This contrasts with previous studies showing that chronic administration of ETHX just before SWDs onset in different animal models of AE led to a quasi-suppression of SWDs, up to 1 month after treatment arrest (Blumenfeld et al. 2008; Russo et al. 2010, 2011; Sarkisova et al. 2010; Dezsi et al. 2013; for review, see Russo et al. 2016). The reasons for this discrepancy are still unclear. This may reflect heterogeneity in the duration of the anti-epileptic treatment that was much longer (≥ 4 months) in the aforementioned reports (see also Van Luijtelea et al. 2013) and could, in some cases, exceed the period of epileptogenesis. This suggests that the observed decrease in seizure activity could have been the result of combined anti-epileptogenic and anti-epileptic effects. The lack of changes in SWD number and duration described in the present study, after a chronic treatment strictly targeting the latent period devoid of SW activity, indicates that such short treatment with current AEDs is not ineffective for targeting the cellular and network defects emerging in GAERS during the epileptogenesis period and highlights the need to develop new and specific medications (Löscher et al. 2013; Pitkänen and Engel 2014; Schmidt and Sillanpää 2016).

In conclusion, our results show that absence epileptogenesis in GAERS is associated with a gradual maturation of SoCx-generated epileptic activities together with progressive alterations in the membrane properties of deep-layer neurons and in their afferent synaptic networks. This suggests that the heterogeneity in the electrical features of seizures in untreated newly diagnosed patients with childhood AE (Sadleir et al. 2006) could reflect differences in the stage of maturation at the time of diagnosis. The precise characterization of the epileptogenic processes is of crucial importance to better define an appropriate therapeutic window and specific treatments. Our findings indicate that current AEDs, which are highly effective for SWDs suppression, are not good candidates to alter or reverse epileptogenesis in GAERS. Given the early onset of epileptic discharges in GEs, drugs specifically targeting the changes occurring during cortical networks development should be able to prevent, reverse, or interrupt the epileptogenic processes.

Supplementary Material

Supplementary data are available at *Cerebral Cortex* online.

Funding

This work was supported by grants from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)*, the *Agence Nationale de la Recherche (ANR, “GliEpi” # R09131CS 2009 and “SoAbsence” # ANR-16-CE37-0021 2016)*, the *Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRG-2009)*, the *Université Pierre et Marie Curie (UPMC)* and the program ‘*Investissements d’avenir*’ ANR-10-IAIHU-06. We also received supports from the French Ministry of Research (GJ, TAB and MSW), the *Fondation Française pour la Recherche sur l’Épilepsie (GJ)* and the *Fondation Chamillard (GJ)*.

Notes

We thank Sylvain Andrieu and Cyrielle Colomb for the GAERS breeding, Claire Beaup for her technical assistance, Benoit Pouyatos for his advice for epileptiform event analysis as well as Laurent Vercueil and Colin Deransart for their suggestions

on the manuscript and their advices. *Conflict of Interest:* None declared.

References

- Adelsberger H, Garaschuk O, Konnerth A. 2005. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci.* 8(8):988–990.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R. 2008. Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci.* 28:12851–12863.
- Akin D, Ravizza T, Maroso M, Carcak N, Eryigit T, Vanzulli I, Aker RG, Vezzani A, Onat FY. 2011. IL-1 β is induced in reactive astrocytes in the somatosensory cortex of rats with genetic absence epilepsy at the onset of spike-and-wave discharges, and contributes to their occurrence. *Neurobiol Dis.* 44(3):259–269.
- Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S, Charpier S. 2014. Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J Physiol (Lond).* 592:3577–3595.
- Baulac M, Pitkänen A. 2009. Research priorities in epilepsy for the next decade—a representative view of the European scientific community: summary of the ILAE Epilepsy Research Workshop, Brussels, 17–18 January 2008. *Epilepsia.* 50: 571–578.
- Ben-Ari Y, Holmes GL. 2006. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol.* 5: 1055–1063.
- Berg AT, Scheffer IE. 2011. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia.* 52(6): 1058–1062.
- Bessaïh T, Bourgeois L, Badiu CI, Carter DA, Toth TI, Ruano D, Lambolez B, Crunelli V, Leresche N. 2006. Nucleus-specific abnormalities of GABAergic synaptic transmission in a genetic model of absence seizures. *J Neurophysiol.* 96: 3074–3081.
- Blumenfeld H, Klein JP, Schridde U, Vestal M, Rice T, Khera DS, Bashyal C, Giblin K, Paul-Laughinghouse C, Wang F, et al. 2008. Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia.* 49:400–409.
- Bureau I, Shepherd GMG, Svoboda K. 2004. Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron.* 42:789–801.
- Carçak N, Aker RG, Ozdemir O, Demiralp T, Onat FY. 2008. The relationship between age-related development of spike-and-wave discharges and the resistance to amygdaloid kindling in rats with genetic absence epilepsy. *Neurobiol Dis.* 32(3):355–363.
- Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V. 1999. On the putative contribution of GABA(B) receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology.* 38: 1699–1706.
- Chatrjian GE, Bergamini L, Dondey M, Klass DW, Lennox-Buchthal M, Petersen I. 1974. A glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 37:538–548.
- Chipaux M, Charpier S, Polack P-O. 2011. Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures. *Neuroscience.* 192:642–651.
- Coenen AM, van Luijtelea EL. 1987. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res.* 1: 297–301.

- Coenen AM, van Luijtelaar EL. 2003. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet.* 33:635–655.
- Connors BW, Gutnick MJ. 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13:99–104.
- Consroe P, Kudray K, Schmitz R. 1980. Acute and chronic anti-epileptic drug effects in audiogenic seizure-susceptible rats. *Exp Neurol.* 70:626–637.
- D'Amore V, Santolini I, van Rijn CM, Biagioni F, Molinaro G, Prete A, Conn PJ, Lindsley CW, Zhou Y, Vinson PN, et al. 2013. Potentiation of mGlu5 receptors with the novel enhancer, VU0360172, reduces spontaneous absence seizures in WAG/Rij rats. *Neuropharmacology.* 66:330–338.
- Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. 1998. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol.* 55:27–57.
- David O, Guillemain I, Sailliet S, Reyt S, Deransart C, Segebarth C, Depaulis A. 2008. Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol.* 6:2683–2697.
- Depaulis A, Van Luijtelaar G. 2006. Genetic models of absence epilepsy in the rat. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Mosshé ML, editors. *Models of seizures and epilepsy.* San Diego: Elsevier Academic press. p. 233–248.
- Depaulis A, David O, Charpier S. 2016. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods.* 260:159–174.
- Deransart C, Depaulis A. 2002. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord.* 4(Suppl 3):S61–S72.
- Deransart C, Riban V, Lê BT, Hechler V, Marescaux C, Depaulis A. 1999. Evidence for the involvement of the pallidum in the modulation of seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Neurosci Lett.* 265:131–134.
- Deransart C, Riban V, Lê BT, Marescaux C, Depaulis A. 2000. Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Neuroscience.* 100:335–344.
- Dezsi G, Ozturk E, Stanic D, Powell KL, Blumenfeld H, O'Brien TJ, Jones NC. 2013. Ethosuximide reduces epileptogenesis and behavioral comorbidity in the GAERS model of genetic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 54:635–643.
- Ellens DJ, Hong E, Giblin K, Singleton MJ, Bashyal C, Englot DJ, Mishra AM, Blumenfeld H. 2009. Development of spike-wave seizures in C3H/HeJ mice. *Epilepsy Res.* 85:53–59.
- Feldmeyer D. 2012. Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat.* 6:1–22.
- Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CCH, Poulet JFA, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C. 2013. Barrel cortex function. *Prog Neurobiol.* 103:3–27.
- Franceschetti S, Sancini G, Panzica F, Radici C, Avanzini G. 1998. Postnatal differentiation of firing properties and morphological characteristics in layer V pyramidal neurons of the sensorimotor cortex. *Neuroscience.* 83:1013–1024.
- Frankel WN. 2005. Development of a new genetic model for absence epilepsy: spike-wave seizures in C3H/He and backcross mice. *J Neurosci.* 25:3452–3458.
- Frick A, Feldmeyer D, Sakmann B. 2007. Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *J Physiol (Lond).* 585:103–116.
- Goldberg EM, Jeong HY, Tremblay R, Lazarenko RM, Rudy B. 2011. Rapid developmental maturation of neocortical FS cell intrinsic excitability. *Cereb Cortex.* 21:666–682.
- Golshani P, Gonçalves JT, Khoshkhou S, Mostany R, Smirnakis S, Portera-Cailliau C. 2009. Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J Neurosci.* 29:10890–10899.
- Grosso S, Galimberti D, Gobbi G, Farnetani M, Di Bartolo RM, Morgese G, Balestri P. 2005. Typical absence seizures associated with localization-related epilepsy: a clinical and electroencephalographic characterization. *Epilepsy Res.* 66:13–21.
- Guillemain I, Kahane P, Depaulis A. 2012. Animal models to study aetiopathology of epilepsy: what are the features to model? *Epileptic Disord.* 14:217–225.
- Hanganu-Opatz IL. 2010. Between molecules and experience: role of early patterns of coordinated activity for the development of cortical maps and sensory abilities. *Brain Res Rev.* 64(1):160–176.
- Hirsch E, Panayiotopoulos CP. 2005. Childhood absence epilepsy and related syndromes. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, editors. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence.* 4th ed.. Montrouge: John Libbey Eurotext. p. 315–335.
- Holt GR, Softky WR, Koch C, Douglas RJ. 1996. Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons. *J Neurophysiol.* 75:1806–1814.
- Kelley MS, Jacobs MP, Lowenstein DH, for the NINDS Epilepsy Benchmark Stewards. 2009. The NINDS epilepsy research benchmarks. *Epilepsia.* 50:579–582.
- Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H. 2004. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res.* 1000:102–109.
- Kole MHP, Bräuer AU, Stuart GJ. 2007. Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *J Physiol (Lond).* 578:507–525.
- Kriegstein AR, Suppes T, Prince DA. 1987. Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain Res.* 431:161–171.
- Löscher W. 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20:359–368.
- Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 12:757–776.
- Luhmann HJ, Sinning A, Yang JW, Reyes-Puerta V, Stüttgen MC, Kirischuk S, Kilb W. 2016. Spontaneous neuronal activity in developing neocortical networks: from single cells to large-scale interactions. *Front Neural Circuits.* 10:40.
- Mahon S, Casassus G, Mulle C, Charpier S. 2003. Spike-dependent intrinsic plasticity increases firing probability in rat striatal neurons in vivo. *J Physiol (Lond).* 550:947–959.
- Mahon S, Charpier S. 2012. Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J Neurosci.* 32:11377–11389.
- Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. 2002. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci.* 22:1480–1495.
- Micheletti G, Vergnes M, Marescaux C, Reis J, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM. 1985. Antiepileptic drug evaluation in a new animal model: spontaneous petit mal epilepsy in the rat. *Arzneimittelforschung.* 35:483–485.
- Micheva KD, Beaulieu C. 1996. Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol.* 373:340–354.

- Minlebaev M, Colonnese M, Tsintsadze T, Sirota A, Khazipov R. 2011. Early γ oscillations synchronize developing thalamus and cortex. *Science*. 334:226–229.
- Mitrukhina O, Suchkov D, Khazipov R, Minlebaev M. 2015. Imprecise whisker map in the neonatal rat barrel cortex. *Cereb Cortex*. 25:3458–3467.
- Ngomba RT, Biagioni F, Casciato S, Willems-van Bree E, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, van Luijtelaar EL. 2005. The preferential mGlu2/3 receptor antagonist, LY341495, reduces the frequency of spike-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*. 49(Suppl. 1):89–103.
- Panayiotopoulos CP. 2005. Idiopathic generalized epilepsies: a review and modern approach. *Epilepsia*. 46:1–6.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Paz JT, Chavez M, Sallet S, Deniau JM, Charpier S. 2007. Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway. *J Neurosci*. 27:929–941.
- Percival D.B., Walden A.T. 1993. *Spectral analysis for physical applications: multitaper and conventional univariate techniques*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pinault D, Vergnes M, Marescaux C. 2001. Medium-voltage 5–9-Hz oscillations give rise to spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: in vivo dual extracellular recording of thalamic relay and reticular neurons. *Neuroscience*. 105(1):181–201.
- Pinault D, Slézia A, Acsády L. 2006. Corticothalamic 5–9 Hz oscillations are more pro-epileptogenic than sleep spindles in rats. *J Physiol*. 574:209–227.
- Pitkänen A, Engel J. 2014. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 11:231–241.
- Polack P-O, Charpier S. 2009. Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia*. 50:1816–1820.
- Polack P-O, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S. 2007. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci*. 27:6590–6599.
- Polack P-O, Mahon S, Chavez M, Charpier S. 2009. Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex*. 19:2078–2091.
- Pouyatos B, Serduc R, Chipaux M, Chabrol T, Bräuer-Krisch E, Nemoz C, Mathieu H, David O, Renaud L, Prezado Y, et al. 2013. Synchrotron X-ray interlaced microbeams suppress paroxysmal oscillations in neuronal networks initiating generalized epilepsy. *Neurobiol Dis*. 51:152–160.
- Rochefort NL, Garaschuk O, Milos RI, Narushima M, Marandi N, Pichler B, Kovalchuk Y, Konnerth A. 2009. Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. *Proc Natl Acad Sci*. 106(35):15049–15054.
- Russo E, Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Di Paola ED, Constanti A, De Sarro G. 2010. Comparison of the antiepileptogenic effects of an early long-term treatment with ethosuximide or levetiracetam in a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia*. 51:1560–1569.
- Russo E, Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Perrota I, Di Paola ED, Constanti A, De Sarro G. 2011. Effects of early long-term treatment with antiepileptic drugs on development of seizures and depressive-like behavior in a rat genetic absence epilepsy model. *Epilepsia*. 52(7):1341–1350.
- Russo E, Citraro R, Constanti A, Leo A, Lüttjohann A, Van Luijtelaar G, de Sarro G. 2016. Upholding WAG/Rij rats as a model of absence epileptogenesis: Hidden mechanisms and a new theory on seizure development. *Neurosci Biobehav Rev*. 71:388–408.
- Sadleir LG, Farrell K, Smith S, Connolly MB, Scheffer IE. 2006. Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy. *Neurology*. 67:413–418.
- Sanchez RM, Jensen FE. 2001. Maturational aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia*. 42:577–585.
- Sarkisova KY, Kuznetsova GD, Kulikov MA, van Luijtelaar G. 2010. spike and wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia*. 51:146–160.
- Schmidt D, Sillanpää M. 2016. Prevention of epilepsy: issues and innovations. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 16:95.
- Shorvon SD. 2011. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 52:1052–1057.
- Silver RA. 2010. Neuronal arithmetic. *Nat Rev Neurosci*. 11:474–489.
- Sitnikova E, van Luijtelaar G. 2007. Electroencephalographic characterization of spike-wave discharges in cortex and thalamus in WAG/Rij rats. *Epilepsia*. 48(12):2296–2311.
- Stern EA, Maravall M, Svoboda K. 2001. Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron*. 31:305–315.
- Strauss U, Kole MHP, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. 2004. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci*. 19:3048–3058.
- Tan HO, Reid CA, Single FN, Davies PJ, Chiu C, Murphy S, Clarke AL, Dibbens L, Krestel H, Mulley JC, et al. 2007. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:17536–17541.
- Tóth TI, Bessaih T, Leresche N, Crunelli V. 2007. The properties of reticular thalamic neuron GABAA IPSCs of absence epilepsy rats lead to enhanced network excitability. *Eur J Neurosci*. 26:1832–1844.
- van de Bovenkamp-Janssen MC, van der Kloet JC, van Luijtelaar G, Roubos EW. 2006. NMDA-NR1 and AMPA-GluR4 receptor subunit immunoreactivities in the absence epileptic WAG/Rij rat. *Epilepsy Res*. 69(2):119–128.
- Van Luijtelaar G, Mishra AM, Edelbroek P, Coman D, Frankenmolen N, Schaapsmeeders P, Covolato G, Danielson N, Niermann H, Janeczko K, et al. 2013. Anti-epileptogenesis: electrophysiology, diffusion tensor imaging and behavior in a genetic absence model. *Neurobiol Dis*. 60:126–138.
- Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. 1986. Ontogeny of spontaneous petit mal-like seizures in Wistar rats. *Brain Res*. 395:85–87.
- Williams MS, Altwegg-Boussac T, Chavez M, Lecas S, Mahon S, Charpier S. 2016. Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model. *J Physiol*. 594(22):6733–6751.
- Yang JW, Hanganu-Opatz IL, Sun JJ, Luhmann HJ. 2009. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci*. 29:9011–9025.
- Zhu JJ. 2000. Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol (Lond)*. 526(Pt 3):571–587.

Références

A

- Adesnik, H., and Scanziani, M. (2010). Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464, 1155–1160.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia — more than just brain glue.
- Althaus, A.L., Zhang, H., and Parent, J.M. (2016). Axonal plasticity of age-defined dentate granule cells in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 86, 187–196.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81, 728–739.
- Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568.
- Audette, N.J., Urban-Ciecko, J., Matsushita, M., and Barth, A.L. (2017). POm Thalamocortical Input Drives Layer-Specific Microcircuits in Somatosensory Cortex. *Cereb. Cortex* 1–17.
- Avanzini, G., de Curtis, M., Marescaux, C., Panzica, F., Spreafico, R., and Vergnes, M. (1992). Role of the thalamic reticular nucleus in the generation of rhythmic thalamo-cortical activities subserving spike and waves. *J. Neural Transm. Suppl.* 35, 85–95.
- Avoli, M., and Gloor, P. (1981). The Effects of Transient Functional Depression of the Thalamus on Spindles and on Bilateral Synchronous Epileptic Discharges of Feline Generalized Penicillin Epilepsy. *Epilepsia* 22, 443–452.

B

- Bai, X., Vestal, M., Berman, R., Negishi, M., Spann, M., Vega, C., Desalvo, M., Novotny, E.J., Constable, R.T., and Blumenfeld, H. (2010). Dynamic Time Course of Typical Childhood Absence Seizures: EEG, Behavior, and Functional Magnetic Resonance Imaging. *J. Neurosci.* 30, 5884–5893.
- Bai, X., Guo, J., Killory, B., Vestal, M., Berman, R., Negishi, M., Danielson, N., Novotny, E.J., Constable, R.T., and Blumenfeld, H. (2011). Resting functional connectivity between the hemispheres in childhood absence epilepsy. *Neurology* 76, 1960–1967.
- Beltramo, R., D’Urso, G., Dal Maschio, M., Farisello, P., Bovetti, S., Clovis, Y., Lassi, G., Tucci, V., De Pietri Tonelli, D., and Fellin, T. (2013). Layer-specific excitatory circuits differentially control recurrent network dynamics in the neocortex. *Nat. Neurosci.* 16, 227–234.
- Ben-Ari, Y. (2008). Neuro-archaeology: pre-symptomatic architecture and signature of neurological disorders. *Trends Neurosci.* 31, 626–636.

- Ben-Ari, Y., and Holmes, G.L. (2006). Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol.* 5, 1055–1063.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., et al. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51, 676–685.
- Berg, A.T., Levy, S.R., Testa, F.M., and Blumenfeld, H. (2014). Long-term seizure remission in childhood absence epilepsy: Might initial treatment matter? *Epilepsia* 55, 551–557.
- Bermudez Contreras, E.J., Schjetnan, A.G.P., Muhammad, A., Bartho, P., McNaughton, B.L., Kolb, B., Gruber, A.J., and Luczak, A. (2013). Formation and reverberation of sequential neural activity patterns evoked by sensory stimulation are enhanced during cortical desynchronization. *Neuron* 79, 555–566.
- Bessaïh, T., Bourgeois, L., Badiu, C.I., Carter, D.A., Toth, T.I., Ruano, D., Lambolez, B., Crunelli, V., and Leresche, N. (2006). Nucleus-Specific Abnormalities of GABAergic Synaptic Transmission in a Genetic Model of Absence Seizures. *J. Neurophysiol.* 96, 3074–3081.
- Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron–glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387–394.
- Blumenfeld, H. (2012). Impaired consciousness in epilepsy. *Lancet Neurol.* 11, 814–826.
- Boucsein, C. (2011). Beyond the cortical column: abundance and physiology of horizontal connections imply a strong role for inputs from the surround. *Front. Neurosci.* 5.
- Bouilleret, V., Hogan, R.E., Velakoulis, D., Salzberg, M.R., Wang, L., Egan, G.F., O’Brien, T.J., and Jones, N.C. (2009). Morphometric abnormalities and hyperanxiety in genetically epileptic rats: A model of psychiatric comorbidity? *NeuroImage* 45, 267–274.
- van der Bourg, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Laurency, B., Wieckhorst, M., Stüttgen, M.C., Luhmann, H.J., and Helmchen, F. (2016). Layer-Specific Refinement of Sensory Coding in Developing Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex.*
- Brecht, M., Preilowski, B., and Merzenich, M.M. (1997). Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav. Brain Res.* 84, 81–97.
- Brill, J., and Huguenard, J.R. (2009). Robust Short-Latency Perisomatic Inhibition onto Neocortical Pyramidal Cells Detected by Laser-Scanning Photostimulation. *J. Neurosci.* 29, 7413–7423.
- Bruno, R.M., Khatri, V., Land, P.W., and Simons, D.J. (2003). Thalamocortical angular tuning domains within individual barrels of rat somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9565–9574.
- Bureau, I., Shepherd, G.M., and Svoboda, K. (2004). Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron* 42, 789–801.

Bureau, I., von Saint Paul, F., and Svoboda, K. (2006). Interdigitated Paralemniscal and Lemniscal Pathways in the Mouse Barrel Cortex. *PLoS Biol.* 4, e382.

Buzsáki, G. (1991). The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience* 41, 351–364.

C

Callaway, E.M., and Luo, L. (2015). Monosynaptic Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 8979–8985.

Caplan, R., Siddarth, P., Stahl, L., Lanphier, E., Vona, P., Gurbani, S., Koh, S., Sankar, R., and Shields, W.D. (2008). Childhood absence epilepsy: Behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 49, 1838–1846.

Castro-Alamancos, M.A. (2000). Origin of Synchronized Oscillations Induced by Neocortical Disinhibition In Vivo. *J. Neurosci.* 20, 9195–9206.

Castro-Alamancos, M.A. (2002a). Different temporal processing of sensory inputs in the rat thalamus during quiescent and information processing states in vivo. *J. Physiol.* 539, 567–578.

Castro-Alamancos, M.A. (2002b). Properties of primary sensory (lemniscal) synapses in the ventrobasal thalamus and the relay of high-frequency sensory inputs. *J. Neurophysiol.* 87, 946–953.

Castro-Alamancos, M.A. (2002c). Role of thalamocortical sensory suppression during arousal: focusing sensory inputs in neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9651–9655.

Castro-Alamancos, M.A., and Rigas, P. (2002). Synchronized oscillations caused by disinhibition in rodent neocortex are generated by recurrent synaptic activity mediated by AMPA receptors. *J. Physiol.* 542, 567–581.

Chahboune, H., Mishra, A.M., DeSalvo, M.N., Staib, L.H., Purcaro, M., Scheinost, D., Papademetris, X., Fyson, S.J., Lorincz, M.L., Crunelli, V., et al. (2009). DTI abnormalities in anterior corpus callosum of rats with spike–wave epilepsy. *NeuroImage* 47, 459–466.

Charpier, S., Leresche, N., Deniau, J.-M., Mahon, S., Hughes, S.W., and Crunelli, V. (1999). On the putative contribution of GABAB receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology* 38, 1699–1706.

Chen, C.-C., Lu, J., Yang, R., Ding, J.B., and Zuo, Y. (2017a). Selective activation of parvalbumin interneurons prevents stress-induced synapse loss and perceptual defects. *Mol. Psychiatry*.

- Chen, K., Zhang, L., Tan, M., Lai, C.S.W., Li, A., Ren, C., and So, K.-F. (2017b). Treadmill exercise suppressed stress-induced dendritic spine elimination in mouse barrel cortex and improved working memory via BDNF/TrkB pathway. *Transl. Psychiatry* 7, tp201741.
- Chipaux, M., Charpier, S., and Polack, P.-O. (2011). Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures. *Neuroscience* 192, 642–651.
- Chipaux, M., Vercueil, L., Kaminska, A., Mahon, S., and Charpier, S. (2013). Persistence of Cortical Sensory Processing during Absence Seizures in Human and an Animal Model: Evidence from EEG and Intracellular Recordings. *PLOS ONE* 8, e58180.
- Coenen, A.M., and Van Luijtelaar, E.L. (1987). The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res.* 1, 297–301.
- Constantinople, C.M., and Bruno, R.M. (2013). Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science* 340, 1591–1594.
- Cope, D.W., Giovanni, G.D., Fyson, S.J., Orbán, G., Errington, A.C., Lőrincz, M.L., Gould, T.M., Carter, D.A., and Crunelli, V. (2009). Enhanced tonic GABA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat. Med.* 15, 1392.
- Cossart, R., Aronov, D., and Yuste, R. (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423, 283–288.
- Costa, M.R., and Müller, U. (2015). Specification of excitatory neurons in the developing cerebral cortex: progenitor diversity and environmental influences. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2009). Cortical Dynamics by Layers. *Neuron* 64, 298–300.
- Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2015). Cortical Sensorimotor Reverberations. *Neuron* 86, 1116–1118.
- Crochet, S., Poulet, J.F.A., Kremer, Y., and Petersen, C.C.H. (2011). Synaptic Mechanisms Underlying Sparse Coding of Active Touch. *Neuron* 69, 1160–1175.
- Cruikshank, S.J., Lewis, T.J., and Connors, B.W. (2007). Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat. Neurosci.* 10, 462–468.
- Crunelli, V., Cope, D.W., and Terry, J.R. (2011). Transition to absence seizures and the role of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res.* 97, 283–289.
- Czéh, B., Varga, Z.K.K., Henningsen, K., Kovács, G.L., Miseta, A., and Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus* 25, 393–405.

D

- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., and Marescaux, C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog. Neurobiol.* 55, 27–57.
- David, O., Guillemain, I., SAILLET, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., and Depaulis, A. (2008). Identifying Neural Drivers with Functional MRI: An Electrophysiological Validation. *PLoS Biol.* 6, e315.
- Davies, S., Heyman, I., and Goodman, R. (2003). A population survey of mental health problems in children with epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* 45, 292–295.
- DeFelipe, J., and Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
- Dehaene, S., and Naccache, L. (2001). Towards a cognitive neuroscience of consciousness: basic evidence and a workspace framework. *Cognition* 79, 1–37.
- Dehaene, S., Charles, L., King, J.-R., and Marti, S. (2014). Toward a computational theory of conscious processing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 25, 76–84.
- DeNardo, L.A., Berns, D.S., DeLoach, K., and Luo, L. (2015). Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing. *Nat. Neurosci.* 18, 1687–1697.
- Depaulis, A., and Charpier, S. (2017). Pathophysiology of absence epilepsy: Insights from genetic models. *Neurosci. Lett.*
- Depaulis, A., David, O., and Charpier, S. (2016). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J. Neurosci. Methods* 260, 159–174.
- Deschênes, M., Veinante, P., and Zhang, Z.-W. (1998). The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res. Rev.* 28, 286–308.
- Deshpande, A., Bergami, M., Ghanem, A., Conzelmann, K.-K., Lepier, A., Götz, M., and Berninger, B. (2013). Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1152–E1161.
- Destexhe, A. (1998). Spike-and-Wave Oscillations Based on the Properties of GABAB Receptors. *J. Neurosci.* 18, 9099–9111.
- Destexhe, A. (1999). Can GABAA conductances explain the fast oscillation frequency of absence seizures in rodents? *Eur. J. Neurosci.* 11, 2175–2181.

Destexhe, A., Contreras, D., and Steriade, M. (1999). Cortically-induced coherence of a thalamic-generated oscillation. *Neuroscience* 92, 427–443.

Dimou, L., and Simons, M. (2017). Diversity of oligodendrocytes and their progenitors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 47, 73–79.

Douglas, R.J., and Martin, K.A. (1991). A functional microcircuit for cat visual cortex. *J. Physiol.* 440, 735–769.

Douglas, R.J., Martin, K.A.C., and Whitteridge, D. (1989). A Canonical Microcircuit for Neocortex. *Neural Comput.* 1, 480–488.

E

Egger, R., Schmitt, A.C., Wallace, D.J., Sakmann, B., Oberlaender, M., and Kerr, J.N.D. (2015). Robustness of sensory-evoked excitation is increased by inhibitory inputs to distal apical tuft dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14072–14077.

Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.

Epsztein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., and Crépel, V. (2005). Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *J. Neurosci.* 25, 8229–8239.

Estebanez, L., Bertherat, J., Shulz, D.E., Bourdieu, L., and Léger, J.-F. (2016). A radial map of multi-whisker correlation selectivity in the rat barrel cortex. *Nat. Commun.* 7, 13528.

F

Fardone, E., Bravin, A., Conti, A., Bräuer-Krisch, E., Requardt, H., Bucci, D., Duc, G.L., Battaglia, G., and Romanelli, P. (2017). Rat sensorimotor cortex tolerance to parallel transections induced by synchrotron-generated X-ray microbeams. *Sci. Rep.* 7, 14290.

Fedderson, B., Vercueil, L., Noachtar, S., David, O., Depaulis, A., and Deransart, C. (2007). Controlling seizures is not controlling epilepsy: a parametric study of deep brain stimulation for epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 27, 292–300.

Feldmeyer, D., Egger, V., Lübke, J., and Sakmann, B. (1999). Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single ‘barrel’ of developing rat somatosensory cortex. *J. Physiol.* 521, 169–190.

Feldmeyer, D., Roth, A., and Sakmann, B. (2005). Monosynaptic Connections between Pairs of Spiny Stellate Cells in Layer 4 and Pyramidal Cells in Layer 5A Indicate That Lemniscal and

Paralemniscal Afferent Pathways Converge in the Infragranular Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* 25, 3423–3431.

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

Feldmeyer, D., Qi, G., Emmenegger, V., and Staiger, J.F. (2017). Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience*.

Feldt Muldoon, S., Soltesz, I., and Cossart, R. (2013). Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3567–3572.

Ferezou, I., Bolea, S., and Petersen, C.C.H. (2006). Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice. *Neuron* 50, 617–629.

Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L.J., Aronoff, R., Weber, B., and Petersen, C.C.H. (2007). Spatiotemporal Dynamics of Cortical Sensorimotor Integration in Behaving Mice. *Neuron* 56, 907–923.

Fino, E., and Yuste, R. (2011). Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron* 69, 1188–1203.

Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., et al. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482.

Fox, K. (2018). Deconstructing the Cortical Column in the Barrel Cortex. *Neuroscience* 368, 17–28.

Frick, A., Feldmeyer, D., Helmstaedter, M., and Sakmann, B. (2008). Monosynaptic Connections between Pairs of L5A Pyramidal Neurons in Columns of Juvenile Rat Somatosensory Cortex. *Cereb. Cortex* 18, 397–406.

G

Garzon, P., Lemelle, L., and Auvin, S. (2016). Épilepsie absence de l'enfant : actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Arch. Pédiatrie* 23, 1176–1183.

Gentet, L.J., Kremer, Y., Taniguchi, H., Huang, Z.J., Staiger, J.F., and Petersen, C.C.H. (2012). Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat. Neurosci.* 15, 607.

Giaume, C. (2010). Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front. Neuroenergetics* 2.

Gilbert, C.D., and Wiesel, T.N. (1983). Clustered intrinsic connections in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 3, 1116–1133.

Glauser, T.A., Cnaan, A., Shinnar, S., Hirtz, D.G., Dlugos, D., Masur, D., Clark, P.O., Capparelli, E.V., and Adamson, P.C. (2010). Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 362, 790–799.

Glauser, T.A., Cnaan, A., Shinnar, S., Hirtz, D.G., Dlugos, D., Masur, D., Clark, P.O., Adamson, P.C., and for the Childhood Absence Epilepsy Study Team (2013). Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy: Initial monotherapy outcomes at 12 months: CAE: Monotherapy Outcome at 12 Months. *Epilepsia* 54, 141–155.

Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., and Neill, J.C. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav. Brain Res.* 285, 176–193.

Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H., and Macklis, J.D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, nrn3586.

H

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

Harris, K.D., and Shepherd, G.M.G. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nat. Neurosci.* 18, 170–181.

Helmstaedter, M., Sakmann, B., and Feldmeyer, D. (2009). Neuronal Correlates of Local, Lateral, and Translaminar Inhibition with Reference to Cortical Columns. *Cereb. Cortex* 19, 926–937.

Holmes, M.D., Brown, M., and Tucker, D.M. (2004). Are “Generalized” Seizures Truly Generalized? Evidence of Localized Mesial Frontal and Frontopolar Discharges in Absence. *Epilepsia* 45, 1568–1579.

I

Inoue, M., Duysens, J., Vossen, J.M., and Coenen, A.M. (1993). Thalamic multiple-unit activity underlying spike-wave discharges in anesthetized rats. *Brain Res.* 612, 35–40.

Isaacson, J.S., and Scanziani, M. (2011). How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* 72, 231–243.

J

Jacob, V., Petreanu, L., Wright, N., Svoboda, K., and Fox, K. (2012). Regular Spiking and Intrinsic Bursting Pyramidal Cells Show Orthogonal Forms of Experience-Dependent Plasticity in Layer V of Barrel Cortex. *Neuron* 73, 391–404.

Jarre, G., Guillemain, I., Deransart, C., and Depaulis, A. (2017a). Chapter 32 - Genetic Models of Absence Epilepsy in Rats and Mice. In *Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)*, A. Pitkänen, P.S. Buckmaster, A.S. Galanopoulou, and S.L. Moshé, eds. (Academic Press), pp. 455–471.

Jarre, G., Altwegg-Boussac, T., Williams, M.S., Studer, F., Chipaux, M., David, O., Charpier, S., Depaulis, A., Mahon, S., and Guillemain, I. (2017b). Building Up Absence Seizures in the Somatosensory Cortex: From Network to Cellular Epileptogenic Processes. *Cereb. Cortex* 27, 4607–4623.

Jones, N.C., Salzberg, M.R., Kumar, G., Couper, A., Morris, M.J., and O'Brien, T.J. (2008). Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp. Neurol.* 209, 254–260.

Jouhanneau, J.-S., Ferrarese, L., Estebanez, L., Audette, N.J., Brecht, M., Barth, A.L., and Poulet, J.F.A. (2014). Cortical fosGFP Expression Reveals Broad Receptive Field Excitatory Neurons Targeted by POM. *Neuron* 84, 1065–1078.

K

Kahane, P., and Depaulis, A. (2010). Deep brain stimulation in epilepsy: what is next? *Curr. Opin. Neurol.* 23, 177–182.

Kampa, B.M., Letzkus, J.J., and Stuart, G.J. (2006). Cortical feed-forward networks for binding different streams of sensory information. *Nat. Neurosci.* 9, 1472–1473.

Kampa, B.M., Letzkus, J.J., and Stuart, G.J. (2007). Dendritic mechanisms controlling spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 456–463.

Kandel, A., and Buzsáki, G. (1997). Cellular–synaptic generation of sleep spindles, spike-and-wave discharges, and evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J. Neurosci.* 17, 6783–6797.

Kasasbeh, A.S., Smyth, M.D., Steger-May, K., Jalilian, L., Bertrand, M., and Limbrick, D.D. (2014). Outcomes After Anterior or Complete Corpus Callosotomy in Children. *Neurosurgery* 74, 17–28.

Katzner, S., Busse, L., and Carandini, M. (2011). GABAA Inhibition Controls Response Gain in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 31, 5931–5941.

Kerekes, P., Daret, A., Shulz, D.E., and Ego-Stengel, V. (2017). Bilateral Discrimination of Tactile Patterns without Whisking in Freely Running Rats. *J. Neurosci.* 37, 7567–7579.

Klein, J.P., Khera, D.S., Nersesyan, H., Kimchi, E.Y., Waxman, S.G., and Blumenfeld, H. (2004). Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res.* 1000, 102–109.

Kleinfeld, D., Ahissar, E., and Diamond, M.E. (2006). Active sensation: insights from the rodent vibrissa sensorimotor system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 435–444.

Kole, M.H.P., Bräuer, A.U., and Stuart, G.J. (2007). Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *J. Physiol.* 578, 507–525.

Kremer, Y., Léger, J.-F., Goodman, D., Brette, R., and Bourdieu, L. (2011). Late Emergence of the Vibrissa Direction Selectivity Map in the Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 31, 10689–10700.

L

Le Van Quyen, M., Amor, F., and Rudrauf, D. (2006). Exploring the dynamics of collective synchronizations in large ensembles of brain signals. *J. Physiol.-Paris* 100, 194–200.

Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J.-C., and Petersen, C.C.H. (2009). The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron* 61, 301–316.

Lerche, H., Jurkat-Rott, K., and Lehmann-Horn, F. (2001). Ion channels and epilepsy. *Am. J. Med. Genet.* 106, 146–159.

Loiseau, P., Duche, B., and Pédespan, J.-M. (1995). Absence epilepsies. *Epilepsia* 36, 1182–1186.

Lopes da Silva, F., Pijn, J.P., and Boeijinga, P. (1989). Interdependence of EEG signals: linear vs. nonlinear associations and the significance of time delays and phase shifts. *Brain Topogr.* 2, 9–18.

Lőrincz, M.L., Gunner, D., Bao, Y., Connelly, W.M., Isaac, J.T.R., Hughes, S.W., and Crunelli, V. (2015). A Distinct Class of Slow (~0.2–2 Hz) Intrinsically Bursting Layer 5 Pyramidal Neurons Determines UP/DOWN State Dynamics in the Neocortex. *J. Neurosci.* 35, 5442–5458.

Lübke, J., and Feldmeyer, D. (2007). Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct. Funct.* 212, 3–17.

Lüders, H., Lesser, R.P., Dinner, D.S., and Morris, H.H. (1984). Generalized epilepsies: a review. *Cleve. Clin. Q.* 51, 205–226.

M

- Mahon, S., and Charpier, S. (2012). Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11377–11389.
- Manita, S., Suzuki, T., Homma, C., Matsumoto, T., Odagawa, M., Yamada, K., Ota, K., Matsubara, C., Inutsuka, A., Sato, M., et al. (2015). A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. *Neuron* 86, 1304–1316.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807.
- Marques-Carneiro, J.E., Faure, J.-B., Cosquer, B., Koning, E., Ferrandon, A., de Vasconcelos, A.P., Cassel, J.-C., and Nehlig, A. (2014). Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control. *Epilepsia* 55, 1460–1468.
- McCormick, D.A., and Sanchez-Vives, M.V. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.* 3, 1027.
- Mease, R.A., Sumser, A., Sakmann, B., and Groh, A. (2016). Cortical Dependence of Whisker Responses in Posterior Medial Thalamus In Vivo. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 26, 3534–3543.
- Meeren, H., van Luijtelaar, G., da Silva, F.L., and Coenen, A. (2005). Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch. Neurol.* 62, 371–376.
- Meeren, H.K.M., Pijn, J.P.M., Van Luijtelaar, E.L.J.M., Coenen, A.M.L., and Lopes da Silva, F.H. (2002). Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1480–1495.
- Merre, P.L., Esmaili, V., Charrière, E., Galan, K., Salin, P.-A., Petersen, C.C.H., and Crochet, S. (2018). Reward-Based Learning Drives Rapid Sensory Signals in Medial Prefrontal Cortex and Dorsal Hippocampus Necessary for Goal-Directed Behavior. *Neuron* 97, 83–91.e5.
- Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Oberlaender, M., Kock, D., P.j, C., Sakmann, B., and Helmstaedter, M. (2010a). Number and Laminar Distribution of Neurons in a Thalamocortical Projection Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cereb. Cortex* 20, 2277–2286.
- Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Hemberger, M., Bruno, R.M., Kock, D., P.j, C., Frick, A., Sakmann, B., and Helmstaedter, M. (2010b). Cell Type–Specific Thalamic Innervation in a Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cereb. Cortex* 20, 2287–2303.
- Mishra, A.M., Bai, X., Motelow, J.E., DeSalvo, M.N., Danielson, N., Sangahanalli, B.G., Hyder, F., and Blumenfeld, H. (2013). Increased resting functional connectivity in spike-wave epilepsy in WAG/Rij rats. *Epilepsia* 54, 1214–1222.

Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., et al. (2011). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472, 191–196.

Mountcastle, V.B. (1957). Modality and Topographic Properties of Single Neurons of Cat's Somatic Sensory Cortex. *J. Neurophysiol.* 20, 408–434.

N

Narayanan, R.T., Egger, R., Johnson, A.S., Mansvelder, H.D., Sakmann, B., de Kock, C.P.J., and Oberlaender, M. (2015). Beyond Columnar Organization: Cell Type- and Target Layer-Specific Principles of Horizontal Axon Projection Patterns in Rat Vibrissal Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 25, 4450–4468.

Nersesyan, H., Herman, P., Erdogan, E., Hyder, F., and Blumenfeld, H. (2004). Relative Changes in Cerebral Blood Flow and Neuronal Activity in Local Microdomains during Generalized Seizures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1057–1068.

Nicholson, C., and Freeman, J.A. (1975). Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J. Neurophysiol.* 38, 356–368.

O

Oberlaender, M., de Kock, C.P.J., Bruno, R.M., Ramirez, A., Meyer, H.S., Dercksen, V.J., Helmstaedter, M., and Sakmann, B. (2012). Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 22, 2375–2391.

O'Connor, D.H., Peron, S.P., Huber, D., and Svoboda, K. (2010). Neural Activity in Barrel Cortex Underlying Vibrissa-Based Object Localization in Mice. *Neuron* 67, 1048–1061.

Ott, D., Siddarth, P., Gurbani, S., Koh, S., Tournay, A., Shields, W.D., and Caplan, R. (2003). Behavioral Disorders in Pediatric Epilepsy: Unmet Psychiatric Need. *Epilepsia* 44, 591–597.

P

Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* - 6th Edition.

Paz, J.T., and Huguenard, J.R. (2015). Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus? *Nat. Neurosci.* 18, 351.

- Penfield, W. (1952). Epileptic automatism and the centrencephalic integrating system. *Res. Publ. - Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 30, 513–528.
- Penfield, W., and Jasper, H.H. (1954). *Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain* (Little, Brown).
- Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.
- Perin, R., Berger, T.K., and Markram, H. (2011). A synaptic organizing principle for cortical neuronal groups. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5419–5424.
- Petersen, C.C.H. (2007). The Functional Organization of the Barrel Cortex. *Neuron* 56, 339–355.
- Petersen, C.C., and Sakmann, B. (2000). The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J. Neurosci.* 20, 7579–7586.
- Petersen, C.C.H., and Crochet, S. (2013). Synaptic computation and sensory processing in neocortical layer 2/3. *Neuron* 78, 28–48.
- Petersen, C.C.H., and Sakmann, B. (2001). Functionally Independent Columns of Rat Somatosensory Barrel Cortex Revealed with Voltage-Sensitive Dye Imaging. *J. Neurosci.* 21, 8435–8446.
- Petersen, C.C.H., Hahn, T.T.G., Mehta, M., Grinvald, A., and Sakmann, B. (2003a). Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13638–13643.
- Petersen, C.C.H., Grinvald, A., and Sakmann, B. (2003b). Spatiotemporal Dynamics of Sensory Responses in Layer 2/3 of Rat Barrel Cortex Measured In Vivo by Voltage-Sensitive Dye Imaging Combined with Whole-Cell Voltage Recordings and Neuron Reconstructions. *J. Neurosci.* 23, 1298–1309.
- Petreaanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., and Svoboda, K. (2007). Channelrhodopsin-2–assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat. Neurosci.* 10, 663.
- Pierret, T., Lavallée, P., and Deschênes, M. (2000). Parallel Streams for the Relay of Vibrissal Information through Thalamic Barreloids. *J. Neurosci.* 20, 7455–7462.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* 65, 113–136.
- Pinault, D. (2003). Cellular interactions in the rat somatosensory thalamocortical system during normal and epileptic 5-9 Hz oscillations. *J. Physiol.* 552, 881–905.
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 1–31.

Pinault, D., Vergnes, M., and Marescaux, C. (2001). Medium-voltage 5–9-Hz oscillations give rise to spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: in vivo dual extracellular recording of thalamic relay and reticular neurons. *Neuroscience* 105, 181–201.

Polack, P.-O., Guillemain, I., Hu, E., Deransart, C., Depaulis, A., and Charpier, S. (2007). Deep Layer Somatosensory Cortical Neurons Initiate Spike-and-Wave Discharges in a Genetic Model of Absence Seizures. *J. Neurosci.* 27, 6590–6599.

Polack, P.-O., Mahon, S., Chavez, M., and Charpier, S. (2009). Inactivation of the Somatosensory Cortex Prevents Paroxysmal Oscillations in Cortical and Related Thalamic Neurons in a Genetic Model of Absence Epilepsy. *Cereb. Cortex* 19, 2078–2091.

Porter, J.T., Johnson, C.K., and Agmon, A. (2001). Diverse Types of Interneurons Generate Thalamus-Evoked Feedforward Inhibition in the Mouse Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 21, 2699–2710.

Poulet, J.F.A., and Petersen, C.C.H. (2008). Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. *Nature* 454, 881–885.

Pouyatos, B., Serduc, R., Chipaux, M., Chabrol, T., Bräuer-Krisch, E., Nemoz, C., Mathieu, H., David, O., Renaud, L., Prezado, Y., et al. (2013). Synchrotron X-ray interlaced microbeams suppress paroxysmal oscillations in neuronal networks initiating generalized epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 51, 152–160.

Pouyatos, B., Nemoz, C., Chabrol, T., Potez, M., Bräuer, E., Renaud, L., Pernet-Gallay, K., Estève, F., David, O., Kahane, P., et al. (2016). Synchrotron X-ray microtransections: a non invasive approach for epileptic seizures arising from eloquent cortical areas. *Sci. Rep.* 6, 27250.

Powell, K.L., Cain, S.M., Ng, C., Sirdesai, S., David, L.S., Kyi, M., Garcia, E., Tyson, J.R., Reid, C.A., Bahlo, M., et al. (2009). A Cav3.2 T-Type Calcium Channel Point Mutation Has Splice-Variant-Specific Effects on Function and Segregates with Seizure Expression in a Polygenic Rat Model of Absence Epilepsy. *J. Neurosci.* 29, 371–380.

Powell, K.L., Tang, H., Ng, C., Guillemain, I., Dieuset, G., Dezsí, G., Çarçak, N., Onat, F., Martin, B., O'Brien, T.J., et al. (2014). Seizure expression, behavior, and brain morphology differences in colonies of Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg. *Epilepsia* 55, 1959–1968.

R

Rakic, P., Ayoub, A.E., Breunig, J.J., and Dominguez, M.H. (2009). Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci.* 32, 291–301.

Reyes-Puerta, V., Sun, J.-J., Kim, S., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2015). Laminar and Columnar Structure of Sensory-Evoked Multineuronal Spike Sequences in Adult Rat Barrel Cortex In Vivo. *Cereb. Cortex* 25, 2001–2021.

Rothschild, G., Eban, E., and Frank, L.M. (2017). A cortical–hippocampal–cortical loop of information processing during memory consolidation. *Nat. Neurosci.* 20, 251–259.

Rudolph, M., and Destexhe, A. (2003). Tuning neocortical pyramidal neurons between integrators and coincidence detectors. *J. Comput. Neurosci.* 14, 239–251.

S

Sakata, S., and Harris, K.D. (2009). Laminar Structure of Spontaneous and Sensory-Evoked Population Activity in Auditory Cortex. *Neuron* 64, 404–418.

Schnepel, P., Kumar, A., Zohar, M., Aertsen, A., and Boucsein, C. (2015). Physiology and Impact of Horizontal Connections in Rat Neocortex. *Cereb. Cortex* 25, 3818–3835.

Schubert, D., Kötter, R., Zilles, K., Luhmann, H.J., and Staiger, J.F. (2003). Cell Type-Specific Circuits of Cortical Layer IV Spiny Neurons. *J. Neurosci.* 23, 2961–2970.

Schubert, D., Kötter, R., and Staiger, J.F. (2007). Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct. Funct.* 212, 107–119.

Schurger, A., Sarigiannidis, I., Naccache, L., Sitt, J.D., and Dehaene, S. (2015). Cortical activity is more stable when sensory stimuli are consciously perceived. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2083–E2092.

Seidenbecher, T., Staak, R., and Pape, H.C. (1998). Relations between cortical and thalamic cellular activities during absence seizures in rats. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1103–1112.

Serduc, R., Bräuer-Krisch, E., Siegbahn, E.A., Bouchet, A., Pouyatos, B., Carron, R., Pannetier, N., Renaud, L., Berruyer, G., Nemoz, C., et al. (2010). High-Precision Radiosurgical Dose Delivery by Interlaced Microbeam Arrays of High-Flux Low-Energy Synchrotron X-Rays. *PLOS ONE* 5, e9028.

Serduc, R., Bouchet, A., Pouyatos, B., Renaud, L., Bräuer-Krisch, E., Duc, G.L., Laissue, J.A., Bartzsch, S., Coquery, N., and Looij, Y. van de (2014). Synchrotron X Ray Induced Axonal Transections in the Brain of Rats Assessed by High-Field Diffusion Tensor Imaging Tractography. *PLOS ONE* 9, e88244.

Shepherd, G.M.G., and Svoboda, K. (2005). Laminar and Columnar Organization of Ascending Excitatory Projections to Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 25, 5670–5679.

- Shepherd, G.M.G., Pologruto, T.A., and Svoboda, K. (2003). Circuit Analysis of Experience-Dependent Plasticity in the Developing Rat Barrel Cortex. *Neuron* 38, 277–289.
- Shepherd, G.M.G., Stepanyants, A., Bureau, I., Chklovskii, D., and Svoboda, K. (2005). Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nat. Neurosci.* 8, 782–790.
- Silberberg, G., and Markram, H. (2007). Disynaptic Inhibition between Neocortical Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells. *Neuron* 53, 735–746.
- Silberberg, G., Grillner, S., LeBeau, F.E.N., Maex, R., and Markram, H. (2005). Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci.* 28, 541–551.
- Sitnikova, E. (2011). Neonatal sensory deprivation promotes development of absence seizures in adult rats with genetic predisposition to epilepsy. *Brain Res.* 1377, 109–118.
- Sreenivasan, V., Esmaili, V., Kiritani, T., Galan, K., Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2016). Movement Initiation Signals in Mouse Whisker Motor Cortex. *Neuron* 92, 1368–1382.
- Staiger, J.F., Flagmeyer, I., Schubert, D., Zilles, K., Kötter, R., and Luhmann, H.J. (2004). Functional Diversity of Layer IV Spiny Neurons in Rat Somatosensory Cortex: Quantitative Morphology of Electrophysiologically Characterized and Biocytin Labeled Cells. *Cereb. Cortex* 14, 690–701.
- Staiger, J.F., Loucif, A.J., Schubert, D., and Möck, M. (2016). Morphological Characteristics of Electrophysiologically Characterized Layer Vb Pyramidal Cells in Rat Barrel Cortex. *PLoS One* 11, e0164004.
- Stroh, A., Adelsberger, H., Groh, A., Rühlmann, C., Fischer, S., Schierloh, A., Deisseroth, K., and Konnerth, A. (2013). Making Waves: Initiation and Propagation of Corticothalamic Ca²⁺ Waves In Vivo. *Neuron* 77, 1136–1150.
- Studer, F., Serduc, R., Pouyatos, B., Chabrol, T., Bräuer-Krisch, E., Donzelli, M., Nemoz, C., Laissue, J.A., Estève, F., and Depaulis, A. (2015). Synchrotron X-ray microbeams: A promising tool for drug-resistant epilepsy treatment. *Phys. Med.* 31, 607–614.

T

- Telfeian, A.E., and Connors, B.W. (1998). Layer-Specific Pathways for the Horizontal Propagation of Epileptiform Discharges in Neocortex. *Epilepsia* 39, 700–708.
- Tovote, P., Esposito, M.S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J.P., Markovic, M., Wolff, S.B.E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., et al. (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*.
- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292.

Tucker, D.M., Brown, M., Luu, P., and Holmes, M.D. (2007). Discharges in ventromedial frontal cortex during absence spells. *Epilepsy Behav.* 11, 546–557.

U

Uhlhaas, P.J., and Singer, W. (2006). Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology. *Neuron* 52, 155–168.

V

Veinante, P., and Deschênes, M. (1999). Single- and Multi-Whisker Channels in the Ascending Projections from the Principal Trigeminal Nucleus in the Rat. *J. Neurosci.* 19, 5085–5095.

Veinante, P., and Deschênes, M. (2003). Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J. Comp. Neurol.* 464, 98–103.

Veinante, P., Lavallée, P., and Deschênes, M. (2000). Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 424, 197–204.

Vercueil, L., Benazzouz, A., Deransart, C., Bressand, K., Marescaux, C., Depaulis, A., and Benabid, A.L. (1998). High-frequency stimulation of the sub-thalamic nucleus suppresses absence seizures in the rat: comparison with neurotoxic lesions. *Epilepsy Res.* 31, 39–46.

Vergnes, M., Marescaux, C., Lannes, B., Depaulis, A., Micheletti, G., and Warter, J.-M. (1989). Interhemispheric desynchronization of spontaneous spike-wave discharges by corpus callosum transection in rats with petit mal-like epilepsy. *Epilepsy Res.* 4, 8–13.

Vergnes, M., Marescaux, C., Boehrer, A., and Depaulis, A. (1991). Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res.* 9, 97–104.

W

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36, 209–217.

Walker, F., Möck, M., Feyerabend, M., Guy, J., Wagener, R.J., Schubert, D., Staiger, J.F., and Witte, M. (2016). Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. *Nat. Commun.* 7, 13664.

- Wall, N.R., Parra, M.D.L., Sorokin, J.M., Taniguchi, H., Huang, Z.J., and Callaway, E.M. (2016). Brain-Wide Maps of Synaptic Input to Cortical Interneurons. *J. Neurosci.* 36, 4000–4009.
- Wendling, F., Bartolomei, F., Bellanger, J.J., and Chauvel, P. (2001). Interpretation of interdependencies in epileptic signals using a macroscopic physiological model of the EEG. *Clin. Neurophysiol.* 112, 1201–1218.
- Wendling, F., Ansari-Asl, K., Bartolomei, F., and Senhadji, L. (2009). From EEG signals to brain connectivity: A model-based evaluation of interdependence measures. *J. Neurosci. Methods* 183, 9–18.
- Wester, J.C., and Contreras, D. (2012). Columnar Interactions Determine Horizontal Propagation of Recurrent Network Activity in Neocortex. *J. Neurosci.* 32, 5454–5471.
- Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J.O., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.-K., Young, J.A.T., and Callaway, E.M. (2007). Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons. *Neuron* 53, 639–647.
- Wilent, W.B., and Contreras, D. (2005). Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* 8, 1364–1370.
- Williams, M.S., Altwegg-Boussac, T., Chavez, M., Lecas, S., Mahon, S., and Charpier, S. (2016). Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model: Epileptic seizures and information processing. *J. Physiol.*
- Wimmer, V.C., Bruno, R.M., Kock, D., P.j, C., Kuner, T., and Sakmann, B. (2010). Dimensions of a Projection Column and Architecture of VPM and POm Axons in Rat Vibrissal Cortex. *Cereb. Cortex* 20, 2265–2276.
- Wirrell, E.C., Camfield, C.S., Camfield, P.R., Dooley, J.M., Gordon, K.E., and Smith, B. (1997). Long-term Psychosocial Outcome in Typical Absence Epilepsy: Sometimes a Wolf in Sheeps' Clothing. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 151, 152–158.
- Wonders, C.P., and Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 687–696.
- Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 17, 205–242.
- Wu, H.-P.P., Ioffe, J.C., Iverson, M.M., Boon, J.M., and Dyck, R.H. (2013). Novel, whisker-dependent texture discrimination task for mice. *Behav. Brain Res.* 237, 238–242.

X

- Xu, X., and Callaway, E.M. (2009). Laminar Specificity of Functional Input to Distinct Types of Inhibitory Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 29, 70–85.

Y

Yalçın, Ö. (2012). Genes and molecular mechanisms involved in the epileptogenesis of idiopathic absence epilepsies. *Seizure* 21, 79–86.

Yan, B., and Li, P. (2013). The emergence of abnormal hypersynchronization in the anatomical structural network of human brain. *NeuroImage* 65, 34–51.

Yu, J., Gutnisky, D.A., Hires, S.A., and Svoboda, K. (2016). Layer 4 fast-spiking interneurons filter thalamocortical signals during active somatosensation. *Nat. Neurosci.* 19, 1647–1657.

Résumé

Les neurones du cortex sont organisés en réseaux qui permettent de réaliser des fonctions complexes. Des anomalies des connexions neuronales qui forment ces réseaux peuvent altérer son fonctionnement et générer des activités pathologiques comme c'est le cas dans certaines formes d'épilepsie. L'épilepsie-absence est caractérisée par des crises généralisées non-convulsives présentant lors d'un enregistrement électroencéphalographique des décharges de pointes-ondes (DPO) bilatérales et synchrones qui s'accompagnent d'une altération de la conscience. Plusieurs équipes ont montré chez l'Homme et dans des modèles animaux que ces DPO sont initiées au niveau du cortex. Cependant, notre connaissance des altérations de connectivité neuronale qui sous-tendent ces activités reste encore très limitée. Nous avons émis l'hypothèse que les DPO sont favorisées par une connectivité neuronale exacerbée. Nous avons examiné cette hypothèse dans un modèle génétique d'épilepsie-absence, le rat GAERS. En étudiant la connectivité structurelle du cortex somatosensoriel primaire, aire d'initiation des DPO chez le GAERS, par traçage rétrograde monosynaptique ainsi que sa connectivité fonctionnelle par enregistrements électrophysiologiques extracellulaires multi-canaux *in vivo*, nous avons caractérisé le circuit de génération et de propagation des DPO entre les couches corticales. Ce circuit pathologique est différent du circuit canonique d'intégration de l'information sensorielle puisque les DPO sont initiées par les neurones des couches profondes. Ces neurones présentent une hyperconnectivité intralaminare globale et translaminaire GABAergique et lorsque l'on altère ces connexions pathologiques, par microtransection rayon-X synchrotron, on réduit la puissance des DPO. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'interférence que pouvait avoir le circuit pathologique sur l'intégration sensorielle. En utilisant un test de discrimination de texture nous avons montré que le traitement de l'information sensorielle liée aux vibrisses n'est pas altéré chez le GAERS. Grâce à des stimulations des vibrisses pendant des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires multi-canaux *in vivo*, nous avons pu montrer que le circuit canonique est fonctionnel chez le GAERS. L'ensemble de nos données suggèrent que, chez le GAERS, les DPO sont sous-tendues par un réseau structurellement anormal au sein du cortex somatosensoriel mais que ce circuit pathologique n'empêche pas la fonction physiologique de cette région du cortex.

Summary

Cortical neurons are organized in networks which allow complex functions. Abnormalities of neuronal connections composing these networks can lead to functional alterations and pathological activities as in some forms of epilepsy. Absence-epilepsy is characterized by non-convulsive generalized seizures associated with synchronous and bilateral spike-and-wave discharges (SWDs) on electroencephalographic recordings and impairment of consciousness. Many studies in patients and animal models have shown that SWDs are initiated in the cortex but our understanding of underlying neuronal connection alterations remain limited. We hypothesized that SWDs may result from an increased neuronal connectivity. To test this hypothesis, we used a genetic model of absence-epilepsy, the GAERS rat. By studying the structural connectivity of primary somatosensory cortex, the SWDs-initiating area in GAERS, by retrograde monosynaptic tracers and the functional connectivity by *in vivo* multi-channel extracellular electrophysiology, we were able to describe the circuit of SWDs generation and propagation across cortical layers. This pathological circuit is different from the canonical circuit of sensory information processing as SWDs are initiated by deep layer neurons. These neurons present an intralaminar global and a translaminar GABAergic hyperconnectivity and by decreasing these connections by synchrotron-generated microtransections we were able to reduce the power of SWDs. We next investigated if the pathological circuit would interfere with sensory integration. By using a texture discrimination task we showed that sensory information integration is unaltered in GAERS. By using vibrissae stimulations during *in vivo* multi-channel extracellular electrophysiology recordings we showed that the canonical circuit remain functional in GAERS. Altogether, our data suggest that SWDs in GAERS are generated by an abnormal structural network in the somatosensory cortex but that this pathological circuit do not interfere with the physiological function of this brain area.