

DISS. ETH NO. 17572

**Lateral connectivity in cat area 17
investigated by means of iontophoresis and
cortical cooling**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

CYRILLE CLAUDE GIRARDIN

Dipl. Biol. (ETH Zürich)

born July 8, 1978

citizen of
Montmelon, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kevan A.C. Martin, examiner
Prof. Dr. Stephan Neuhaus, co-examiner
PD. Dr. Daniel Kiper, co-examiner

2008

Summary

The primary visual cortex (area 17 or V1) of mammals is highly interconnected. The cortex is about 2 mm thick and is commonly divided into 6 layers. From the retina the visual information reaches the cortex via the thalamus in layer 4 which transmits its input to layers 2 and 3. The axons of these superficial layers contact layer 5 which in turn send its input to layer 6. The loop is closed by layer 6 cell axons returning back to layer 4 and to the thalamus. This feedforward loop is only a partial description of the flow of visual information in area 17. First of all the circuit just described only includes the excitatory cells whereas the cortex contains 20% of inhibitory cells. Secondly, all layers form lateral connections that can extend several millimeters horizontally. These lateral connections are more prominent in the superficial layers where they form patches.

Close inspection of the anatomical structure of excitatory and inhibitory cell axons reveals that they form many lateral connections very close to their cell bodies. These are called short-range lateral connections and they are distinct from the long-range or horizontal connections mentioned in the previous paragraph. Moreover the number of synapses formed by cortical connections are many times more numerous than those of the primary input from the periphery. This suggests that the visual information reaching layer 4 is enormously processed within the cortex. **Chapter 1** gives a short introduction of the anatomical and physiological features related to the results presented in my thesis. The details of the different methods used to perform the experiments are described in **Chapter 2**.

We studied the function of the local lateral connections by inactivating them (**Chapter 3**). All experiments discussed in this work were done in the primary visual cortex of anaesthetised and paralysed adult cats. The inactivations were performed using iontophoresis of γ -aminobutyric acid (GABA). A glass pipette was used to record a single cell while a portion of its lateral input was inactivated with a multi-barreled pipette containing GABA located at a distance of about 500 μm from the recorded cell. The receptive fields of the recorded cells and of the multiunit activity at inactivation sites were plotted on a tangent screen. In this way the preferred orientation of the recorded and the inactivated sites could be obtained. Tuning curves of the recorded cells were measured with sine wave drifting gratings of different orientations under control (no inactivation) and GABA inactivation conditions. Control and iontophoresis periods were interleaved with a typical injection time of 2-3 minutes followed by a recovery/control of 4-5 minutes. This sequence was repeated until a control and a GABA tuning curve was obtained. Direct diffusion of GABA towards the recorded cells is unlikely since the spontaneous activity of the cells did not change during iontophoresis. The main result reported here is a shift in

the preferred orientation of the recorded cells when part of their lateral input was silenced. The shift was significant in 18 out of 62 cells. In general the shift was attractive, that is the cells preferred orientation moved towards the preferred orientation of the inactivation site. This effect might be explained if one considers that excitatory connections extend more laterally than inhibitory connections.

Next we wanted to study the cortical activity at the population level. For this purpose we measured the cortical activity using optical imaging of the intrinsic signals. These results are presented in **Chapter 4**. The goal of these experiments was to discover if the small inactivations described above could produce a general reorganization of the orientation map. The inactivations were performed with GABA. Glutamate was also tested and was expected to produce the opposite effect as GABA. GABA and glutamate were injected in an interleaved manner (control-GABA-control-glutamate-control...) at the same location from different barrels of the same pipette. The standard optical imaging methods was adapted to be able to introduce the (in)activation pipette into the cortex. The modification consisted of using agar to stabilize the cortex instead of a chamber filled with silicon and sealed using a glass window. Here we report that neither GABA (4 locations tested) nor glutamate (3 locations tested) was able to change the general orientation map layout. In other words no consistent changes of orientation preference could be detected under our experimental conditions. This suggest that the general map layout is stable and immune to small perturbations.

Finally, the orientation tuning of single cells was investigated under general inactivation of the cortical circuitry. For this purpose cortical cooling was used (**Chapter 5**). A cooling loop was applied to the cortical surface to deactivate the recorded cells. The temperature of the cooling loop was carefully control to avoid damage. We recorded extracellularly from 59 cells. Under cooled conditions the cells evoked response and spontaneous activity decreased strongly. Nevertheless the orientation tuning curves of the cells were scaled down in a divisive manner without change in selectivity (no change in tuning width). This suggests that orientation selectivity is implemented in a way which is independent of the circuits spontaneous activity. Moreover the spike width recorded extracellularly increased while the cortex was cooled. This shows that dramatic modifications of the cells biophysical properties did not influence the circuit function.

All these results are discussed at the end of the corresponding chapter in paragraphs 3.5, 4.4, and 5.3. A more general discussion of our results in the context of others experiments is provided in **Chapter 6**.

Résumé

Le cortex visuel primaire (aire 17 ou V1) des mammifères est très interconnecté. Le cortex a une épaisseur d'environ 2 mm et est communément divisé en 6 couches. Depuis la rétine, l'information visuelle atteint le cortex, via le thalamus, dans la couche 4, qui transmet son input aux couches 2 et 3. Les axones des couches superficielles contactent la couche 5, qui, à son tour, envoie son input dans la couche 6. La boucle est bouclée par les axones des cellules de la couche 6 qui retournent dans la couche 4 et dans le thalamus. Cette boucle "feedforward" n'est qu'une description partielle du flux des informations dans la région 17. Premièrement, le circuit qui vient d'être décrit n'inclut que les cellules excitatrices alors que le cortex contient 20% de cellules inhibitrices. Deuxièmement, toutes les couches forment des connexions latérales qui s'étendent sur plusieurs millimètres horizontalement. Ses connexions latérales sont plus nombreuses dans les couches superficielles où elles forment des patches.

Une examination attentive de la structure anatomique des axones des cellules excitatrices et inhibitrices montre qu'elle forment beaucoup de connexions latérales très proches de leur corps cellulaire. Elle sont appelées connexions latérales locales (*short-range*) et sont à distinguer des connexions latérales longues (*long-range*) mentionnées dans le paragraphe précédent. De plus, le nombre de synapses formées par les connexions corticales est bien plus important que celui de l'input primaire venant de la périphérie. Cela suggère que l'information visuelle qui atteint la couche corticale 4 est énormément transformée par le cortex. Le **Chapitre 1** donne une courte introduction sur les caractéristiques anatomiques et physiologiques en rapport avec les résultats présentés dans ma thèse. Les détails concernant les différentes techniques utilisées dans les expériences sont décrites dans le **Chapitre 2**. Nous avons étudié les fonctions des connexions latérales locales en les inactivant (**Chapitre 3**). Toutes les expériences décrites dans ce travail ont été effectuées dans le cortex visuel primaire de chats adultes anesthésiés et paralysés. Les inactivations ont été effectuées par iontophorèse d'acide γ -amino-butérique (GABA). Une pipette en verre a été utilisée pour enregistrer une cellule isolée alors qu'une partie de son input latéral était inactivée avec une pipette à barils multiples contenant du GABA et située à une distance d'environ 500 μm latéralement par rapport à la cellule enregistrée. Les champs récepteurs des cellules enregistrées et de l'activité au site d'inactivation ont été tracés sur un écran. De cette manière l'orientation préférée de la cellule enregistrée et celle du site d'inactivation peuvent être obtenues. Les courbes de sélectivité (*tuning curves*) des cellules enregistrées ont été mesurées avec des réseaux sinusoidaux en mouvement (*sine wave drifting gratings*) ayant des orientations différentes dans les conditions de contrôle (pas d'inactivation) et pendant l'injection de GABA. Les périodes de contrôle et d'iontophorèse

étaient intercalées avec des temps d'injection typiques de 2-3 minutes suivis par un temps de récupération/contrôle de 4-5 minutes. Cette séquence était répétée jusqu'à l'obtention d'une courbe de sélectivité pour le contrôle et pour l'injection de GABA. La diffusion directe de GABA jusqu'à la cellule enregistrée est improbable car l'activité spontanée des cellules est restée inchangée durant l'iontophorèse. Ici, le principale résultat rapporté est un changement (*shift*) de l'orientation préférée des cellules enregistrées lorsqu'une partie de leur input latéral est supprimée. Le changement est significatif pour 18 cellules sur 62. En général le changement est attractif, ce qui signifie que l'orientation préférée des cellules change en direction de l'orientation préférée du site inactivé. Cet effet peut être expliqué si l'on considère que les connections latérales excitatrices sont plus longues que les connections latérales inhibitrices.

Ensuite nous voulions étudier l'activité corticale au niveau de la population de cellules. Dans ce but nous avons mesuré l'activité corticale avec l'imagerie optique des signaux intrinsèques (*optical imaging of the intrinsic signals*). Ces résultats sont présentés au **Chapitre 4**. Le but de ces expériences était de découvrir si les petites inactivations décrites ci-dessus pouvaient produire une réorganisation générale de la carte des orientations (*orientation map*). Les inactivations ont été effectuées avec du GABA. Du glutamate a également été testé et l'effet attendu était l'opposé de celui produit par le GABA. Le GABA et le glutamate ont été injectés de façon alternée (contrôle-GABA-contrôle-glutamate-contrôle-...) au même endroit depuis des barils différents de la même pipette. La méthode standard d'imagerie optique a été modifiée afin de pouvoir introduire la pipette d'(in)activation dans le cortex. La modification consistait à utiliser de l'agar au lieu d'une chambre remplie d'huile de silicium et fermée à l'aide d'une vitre pour stabiliser le cortex. Nous rapportons ici que ni les injections de GABA (4 endroits testés) ni celles de glutamate (3 endroits testés) n'ont produit de changement général dans la structure de la carte des orientations. Cela suggère que la structure générale de la carte des orientations est stable et insensible à de petites perturbations.

Finalement, la courbe de sélectivité pour l'orientation de cellules isolées a été étudié lors d'inactivations générales des circuits corticaux. Dans ce but, le refroidissement cortical a été utilisé (**Chapitre 5**). Une boucle de refroidissement (*cooling loop*) a été appliquée sur la surface du cortex pour désactiver les cellules enregistrées. La température était soigneusement contrôlée afin d'éviter les dommages. Nous avons enregistré extracellulairement 59 cellules. Dans les conditions de refroidissement les réponses des cellules et leur activité spontanée étaient fortement réduites. Néanmoins l'amplitude des courbes de sélectivité pour l'orientation des cellules était réduite par une division sans changement de sélectivité (pas de changement de largeur de la courbe). Cela suggère que la sensibilité pour l'orientation est implémentée indépendamment de l'activité spontanée du circuit. De plus la largeur du potentiel d'action enregistré extracellulairement augmentait lorsque le cortex était refroidi. Cela montre que de grandes modifications des propriétés biophysiques des cellules n'influencent pas la fonction du circuit.

Tous ces résultats sont discutés dans les chapitres correspondants, aux paragraphes 3.5, 4.4, and 5.3. Une discussion plus générale des nos résultats dans le contexte d'expériences effectuées par d'autres apparaît aux **Chapitre 6**.