

Université de Montréal

Myélinisation des projections corticales visuelles de la souris

par Jolanie Roy

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

en extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences biomédicales

option médecine expérimentale

Octobre 2020

© Jolanie Roy, 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Université du Québec à Trois-Rivières

Département d'anatomie

Ce mémoire intitulé

Myélinisation des projections corticales visuelles de la souris

Présenté par

Jolanie Roy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Johannes Frasnelli

Président-rapporteur

Denis Boire

Directeur de recherche

Mathieu Vanni

Membre du jury

Résumé

La gaine de myéline qui entoure les axones joue plusieurs rôles, comme l'accélération de la propagation de l'influx nerveux, la synchronisation des aires corticales, la plasticité, un support métabolique, etc. Sa dégénérescence lors de certaines pathologies, comme la sclérose en plaques, cause d'importants problèmes dont des déficits de la coordination motrice et de la démence. C'est pourquoi il est important de comprendre l'origine et la nature des axones myélinisés. L'objectif de ce mémoire est de voir si les axones des projections sensorielles corticocorticales sont myélinisés. Pour ce faire, des injections de *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine (Phal), un traceur neuronal antérograde, ont été faites dans le cortex visuel primaire de la souris. Les axones marqués et la gaine de myéline ont été révélés avec de l'immunohistochimie dirigée contre le Phal et la protéine de base de la myéline (MBP) respectivement. Les coupes ont été observées au microscope confocal pour chercher la colocalisation de Phal et MBP, qui indiquerait la présence d'axones myélinisés. Plusieurs axones corticocorticaux ipsilatéraux cheminent dans la matière grise. De ces axones, étonnamment peu d'axones myélinisés ont été trouvés. La myélinisation des axones qui s'engageaient dans la matière blanche a été plus difficile à déterminer avec certitude. Certains segments d'axones Phal+ clairement sans myéline ont été observés. Puisque la densité de MBP de la matière blanche était trop élevée, il était impossible de déterminer la colocalisation du Phal et MBP sur des axones individuels. La microscopie électronique a permis de voir des axones marqués individuellement myélinisés dans la matière blanche.

Mots-clés : Cortex visuel, Myéline, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine, Souris, Axones, Traçage, Myéloarchitecture, MBP.

Abstract

Myelin that ensheathes neuronal axons plays many roles. It increases propagation speed of action potentials and contributes to synchronizing activity between cortical areas. Myelin is plastic and provides a metabolic support for axons. Many diseases, like multiple sclerosis, are linked to the loss of the myelin sheath around axons. For that, it is important to better understand the nature of myelinated axons. Our objective here is to determine whether axons of sensory cortico-cortical projections, are myelinated. To achieve this goal, injections of the anterograde neuronal tracer, leucoagglutinin of *Phaseolus vulgaris* (Phal) were made in the primary visual cortex of mice. Double immunohistochemistry was used to reveal axons labeled with Phal combined with visualisation of the myelin basic protein (MBP). Sections were observed under a confocal microscope to find colocalization of Phal and MBP staining. Many ipsilateral corticocortical axons travel in the gray matter. Of these, surprisingly few myelinated axons were seen. Determining myelination of Phal labeled axons within the white matter tracts and external capsule was more difficult. The MBP staining of white matter was too dense to allow to unambiguously determine whether individual axons were myelinated. However, some clearly unmyelinated axons were observed therein. To solve this ambiguity, electron microscopic analysis was performed. Myelinated Phal-labeled axons were observed in the EC with electron microscopy.

Keywords : Visual cortex, myelin, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin, Mice, axons, Tracing, Myeloarchitecture, MBP.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Table des matières..... | iii |
| Liste des tableaux..... | vi |
| Liste des figures..... | vii |
| Liste des symboles et abréviations..... | viii |
| Remerciements..... | xii |
| Chapitre 1 Introduction..... | 13 |
| Revue de littérature..... | 17 |
| Myéline..... | 17 |
| Facteurs déterminant la myélinisation..... | 25 |
| Myéloarchitecture..... | 31 |
| Identité des axones myélinisés..... | 33 |
| Connectivité corticale visuelle..... | 38 |
| Objectifs..... | 39 |
| Chapitre 2 Méthodologie..... | 41 |
| Animaux..... | 42 |
| Traçage neuronal..... | 43 |
| Iontophorèse..... | 43 |
| Transport axonal..... | 44 |
| Phaseolus vulgaris Leucoagglutinine..... | 45 |
| Microscopie photonique..... | 47 |
| Microscopie électronique..... | 48 |
| Chirurgie..... | 49 |
| Perfusion..... | 51 |
| Immunohistochimie..... | 51 |

| | |
|--|-----|
| Traitement pour microscopie électronique | 53 |
| Chapitre 3 Myelination of the corticocortical projection in gray and white matter from the primary visual cortex. | 55 |
| Abstract | 57 |
| Introduction | 58 |
| Methods..... | 60 |
| Surgery | 61 |
| Immunohistochemistry | 61 |
| Imaging and Analysis | 63 |
| Results..... | 64 |
| Discussion | 77 |
| Phal and MBP staining..... | 77 |
| Gray matter axons | 78 |
| White matter axons | 81 |
| Future perspective..... | 82 |
| Conclusion | 82 |
| Conflict of interest | 82 |
| Chapitre 4 Résultats supplémentaires | 84 |
| Microscopie photonique..... | 85 |
| Problème de la pénétration des anticorps..... | 85 |
| Structure sous-corticale..... | 87 |
| Microscopie électronique..... | 90 |
| Chapitre 5 Discussion supplémentaire..... | 93 |
| Pénétration des anticorps | 94 |
| Microscopie photonique..... | 95 |
| Microscopie électronique..... | 97 |
| Structures sous-corticales..... | 98 |
| Fonction de la myéline..... | 98 |
| Limitation..... | 99 |
| Perspectives futures | 100 |

| | |
|----------------------------|-----|
| Chapitre 6 Conclusion..... | 101 |
| Bibliographie..... | i |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 2.1 Type d'injections chez la souris C57BL/6J | 42 |
| Table 3.1. Antibodies informations | 63 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1.1 Ultrastructure d'une gaine de myéline entourant un axone spinal chez le chien. ... | 17 |
| Figure 1.2. Enroulement de la myéline..... | 18 |
| Figure 1.3. Augmentation de la vitesse de conduction pour des axones myélinisés et non myélinisés en fonction du diamètre de l'axone..... | 20 |
| Figure 1.4. Conduction saltatoire..... | 22 |
| Figure 1.5. Pourcentage des axones myélinisés et non myélinisés de différents diamètres dans la matière blanche du lobe occipital..... | 28 |
| Figure 1.6. Schéma des fibres myélinisées tangentielles et radiales..... | 31 |
| Figure 1.7. Comparaison de la myéloarchitecture du cortex visuel du rat et de l'humain. | 32 |
| Figure 1.8. Densité des axones myélinisés GABAergiques du cortex somatosensoriel de la souris..... | 35 |
| Figure 1.9. Réseau de connectivité de V1..... | 39 |
| Figure 2.1 . Injection par iontophorèse. | 50 |
| Figure 2.2. Bregma et lambda de la souris..... | 50 |
| Figure 3.1. Photomicrograph of Phal staining | 66 |
| Figure 3.2. Myeloarchitecture of the mouse. | 68 |
| Figure 3.3. Photomicrograph of ipsilateral V1-V2L border. | 70 |
| Figure 3.5. Double-labeled axons. | 73 |
| Figure 3.6. Photomicrograph of contralateral V1 terminal field. | 75 |
| Figure 3.7. Photomicrograph of white matter. To | 76 |
| Figure 4.1. Photomicrographie de la pénétration de la myéline dans les coupes. A | 86 |
| Figure 4.2. Photomicrographie de la pénétration du Phal dans les coupes..... | 87 |
| Figure 4.3. Photomicrographie de la matière blanche sous-corticale | 89 |
| Figure 4.4. Photomicrographie du corps calleux en microscopie électronique..... | 91 |
| Figure 4.5. Photomicrographie de la matière blanche corticale sous V1 en microscopie électronique..... | 92 |
| Figure 5.1. Blocage de la diffusion par les anticorps..... | 94 |

Liste des symboles et abréviations

A : Cortex visuel secondaire antérieur

AL : Cortex visuel secondaire antérolatéral

AM : Cortex visuel secondaire antéromédial

ATP : Adénosine triphosphate

BDA : Biotine dextran amine

BF : Champ de tonneau du cortex somatosensoriel

BNP : Onguent ophtalmique de sulfates de néomycine et polymyxine B, et bacitracine, USP stérile

CNP : 2', 3' -Cyclic nucleotide 3' -phosphodiesterase

CoPA : Axones commissuraux primaires

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DLG : Corps genouillé latéral dorsal

EC : Capsule externe

EMS : Electron Microscopy Sciences

GABA : Acide γ -aminobutyrique

IRM : Imagerie par résonance magnétique

InG : Couche profonde de la matière grise du collicule supérieur

LI : Cortex visuel secondaire latéro-intermédiaire

LM : Cortex visuel secondaire latéromédial

MAG : Glycoprotéine associée à la myéline

MBP : Protéine basique de la myéline (en anglais : Myelin basic protein)

MS : Sclérose en plaques

NDS : Sérum d'âne normal

Nogo : Protéine de la myéline inhibitrice de croissance neuronale

OMgp : Glycoprotéine associée aux oligodendrocytes

OPC : Précurseur d'oligodendrocytes

OP : faisceau optique

P : Cortex visuel secondaire postérieur

PAF/PFA : Paraformaldéhyde

PB : Tampon phosphate

PBS : Tampon phosphate salé

Phal : *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine

PIP₂ : Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate

PLP: Protéine protéolipide

PM : Cortex visuel secondaire postéromédial

POR : Cortex visuel secondaire postérieur

PV+ : Parvalbumine positif

RL : Cortex visuel secondaire rostral latéral

RSG : Cortex rétrosplénial granulaire

SC : Collicules supérieurs

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SupG : Couche superficielle de la matière grise du collicule supérieur

V1 : Cortex Visuel primaire

V2L : Cortex visuel secondaire latéral

V2LM : Cortex visuel secondaire latéral médial

V2M : Cortex visuel secondaire médial

Je dédie mon mémoire à ma famille.

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr. Denis Boire, Ph.D. professeur au département d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'aimerais aussi remercier Denis de m'avoir encouragé à participer à des congrès et concours ainsi que de m'avoir encadrée. J'ai beaucoup appris dans son laboratoire, autant pour les manipulations que pour l'organisation et l'écriture. Cette expérience me sera très utile pour le futur.

J'aimerais remercier mes collègues, Ève-Marie Frigon et Bruno Oliveira Ferreira de Souza qui m'ont beaucoup aidée et appris tout au long de ma maîtrise. La vie de laboratoire agréable a rendu l'expérience de la maîtrise plaisante. Leur soutien et leurs idées lors des moments plus difficiles ont été très appréciés.

J'aimerais remercier ma famille pour leur soutien sans failles et leurs encouragements lors de ma maîtrise. Ma famille a été une part importante pour me permettre d'accomplir ma maîtrise. Leur intérêt et leur aide ont été très précieux. J'aimerais particulièrement remercier mes parents qui m'ont soutenu tout le long de mon parcours académique. Ils m'ont soutenue dans mes choix et m'ont aidée à accomplir mes objectifs. J'aimerais remercier mon partenaire de vie pour son soutien et sa patience lors de ma maîtrise. Son soutien a été très important et sa patience lors des moments difficiles m'a permis de passer au travers sans difficulté.

J'aimerais remercier le FRQNT pour le soutien financier lors de la maîtrise. Ce soutien financier a été très important pour me permettre de faire sans stress financier ma maîtrise.

Chapitre 1 Introduction

La gaine de myéline, qui enveloppe les axones, augmente la vitesse de propagation de l'influx nerveux (Hartline & Colman, 2007; Moore, Joyner, Brill, Waxman, & Najar-Joa, 1978; Seidl, 2014; Waxman & Bennett, 1972). Cette augmentation de la vitesse de transfert joue aussi un rôle important dans la synchronisation de l'activité corticale entre les cortex (Pajevic, Basser, & Fields, 2014) et l'intégration neuronale (Thomson & Bannister, 2003; Turner, 2019). De plus, la myéline réduit les coûts métaboliques des axones (Harris & Attwell, 2012; Nave, 2010) et est impliquée dans la plasticité cérébrale (Barrera et al., 2013; Gibson et al., 2014; Grados-Munro & Fournier, 2003; McKenzie et al., 2014; Purger, Gibson, & Monje, 2016).

Puisque la myéline contribue à ces fonctions importantes, les pathologies associées à la démyélinisation des axones entraînent des pertes fonctionnelles significatives. Par exemple, la sclérose en plaques (multiple sclerosis, MS), qui cause la démyélinisation des axones du cerveau et de la moelle épinière, entraîne des pertes de coordinations motrices et de la démence (Rohkamm, 2014). Pour mieux comprendre les pathologies liées à la démyélinisation des axones, il est important de connaître l'identité des axones myélinisés : d'où ils proviennent et où ils se dirigent.

Le cortex cérébral comprend une abondante population d'axones myélinisés dont on ignore largement l'identité. Une étude récente a démontré que 50 % des axones myélinisés des couches superficielles du cortex proviennent des interneurons corticaux GABAergiques (Micheva et al., 2016). Cette proportion d'axones myélinisés GABAergiques diminue avec la profondeur corticale, signifiant que la majorité des axones myélinisés des couches profondes ne sont pas GABAergiques (Micheva et al., 2016). Ces axones myélinisés des couches profondes sont présumés être ceux des neurones pyramidaux excitateurs de projection.

Des études de myéloarchitecture ont démontré que les fibres tangentielles (les fibres organisées parallèlement à la surface piaie, Voir figure 1.6) sont caractéristiques des couches profondes (Zilles et al., 2016). Ces fibres pourraient être des axones corticocorticaux ipsilatéraux, puisqu'ils cheminent dans ces couches corticales (Watakabe & Hirokawa, 2018). La nature de ces fibres myélinisées n'est cependant pas démontrée. De plus, puisque les connexions controlatérales cheminent principalement dans la matière blanche (Watakabe & Hirokawa, 2018), on pourrait s'attendre à ce que les axones des projections corticocorticales calleuses soient principalement myélinisés.

Le cortex visuel primaire envoie des projections au cortex cérébral controlatéral par le corps calleux, ainsi qu'aux aires extrastriées ipsilatérales proches. Ces doubles projections permettraient de vérifier si la myélinisation des axones controlatéraux et ipsilatéraux diffère, ce qui signifie qu'il possède de longues et courtes projections corticocorticales (Olavarria, Bock, Leigland, & Kroenke, 2012; Olavarria & Safaeian, 2006; Zhang et al., 2019). De plus, le cortex visuel primaire projette à environ neuf aires corticales extrastriées par le biais de plusieurs connexions corticocorticales (Froudarakis et al., 2019; Montero, 1993; Wang & Burkhalter, 2007). Ces aires corticales extrastriées étant bien connues, il est possible d'étudier la myélinisation de ses axones corticocorticaux.

L'objectif de cette étude est de voir si les projections efférentes du cortex visuel primaire aux aires extrastriées, controlatérales et ipsilatérales, sont myélinisées. Pour ce faire, des injections d'un traceur antérograde dans le cortex visuel primaire de la souris seront combinées avec la révélation immunohistochimique de la protéine de base de la myéline (myelin basic

protein, MBP), ce qui va permettre de déterminer si les axones des projections efférentes corticocorticales visuelles sont myélinisés.

Revue de littérature

Myéline

Structure

La gaine de myéline, qui entoure certains axones, est un enroulement en plusieurs couches de membranes cellulaires, composées de lipides et de protéines (Bear, Connors, & Paradiso, 2016). Sa forte teneur lipidique lui donne son apparence blanchâtre. La myéline est produite par les oligodendrocytes dans le système nerveux central (SNC) ou des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) (Bear et al., 2016; Nave, 2010). La gaine de myéline

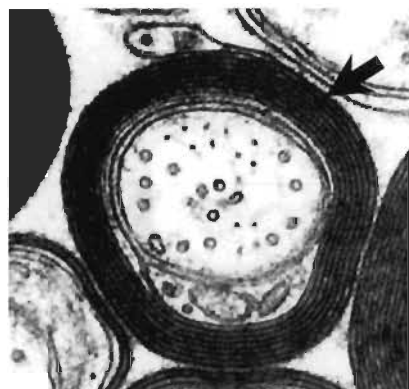


Figure 1.1 Ultrastructure d'une gaine de myéline entourant un axone spinal chez le chien.

Grossissement de 150 000 diamètres.
Image adaptée de Morell et Norton (1980).

prend la forme d'une spirale très serrée autour des axones, comme dans l'image d'un axone spinal d'un chien de la Figure 1.1 (Bear et al., 2016; Nave, 2010; Salzer & Zalc, 2016). Les couches de la spirale sont très clairement définies en microscopie électronique, ce qui permet de s'assurer de la myélinisation d'un axone (Figure 1.1).

La myéline du système nerveux central est composée de 70 à 75 % de lipides (Baron & Hoekstra, 2010; Salzer & Zalc, 2016). La proportion de lipides est très élevée par rapport aux autres membranes eucaryotes (Jahn, Tenzer, & Werner, 2009). Le cholestérol, les glycosphingolipides, les galactosylcéramides et les plasmagènes sont les principaux lipides la composant avec un ratio moléculaire de 2 : 2 : 1 : 1 respectivement (Baron & Hoekstra, 2010; Jahn et al., 2009). La haute teneur en cholestérol change ses propriétés biophysiques

membranaires en augmentant sa fluidité et permettrait ainsi à sa membrane cellulaire de courber autour des axones (Huttner & Zimmerberg, 2001; Jahn et al., 2009).

Les protéines contribuent à la hauteur de 30 % de la composition de la myéline. Il existerait environ 294 protéines de la myéline dans le SNC de la souris (Jahn et al., 2009). Les trois principales protéines composeraient environ 29 % de toutes les protéines de la myéline. La protéolipide (PLP), la « myelin basic protein » (MBP) et la 2', 3' -Cyclic nucleotide 3' -phosphodiesterase (CNP) contribuent pour 17 %, 8 % et 4 % respectivement du total de protéines associées à la myéline (Jahn et al., 2009; Nave & Werner, 2014).

Lors de l'enroulement de la myéline, la membrane de l'oligodendrocyte se plie en deux, formant ainsi un double feuillet qui s'enroule autour de l'axone (Morell & Norton, 1980). Les faces internes de la feuille de myéline se lient ensemble, fusionnant presque, alors que les faces externes ne font que s'apposer l'une sur l'autre (Figure 1.2) (Morell & Norton, 1980). Cette fusion des faces internes permet la compaction serrée de la gaine de myéline autour des axones (Morell & Norton, 1980). En se compactant ainsi, le

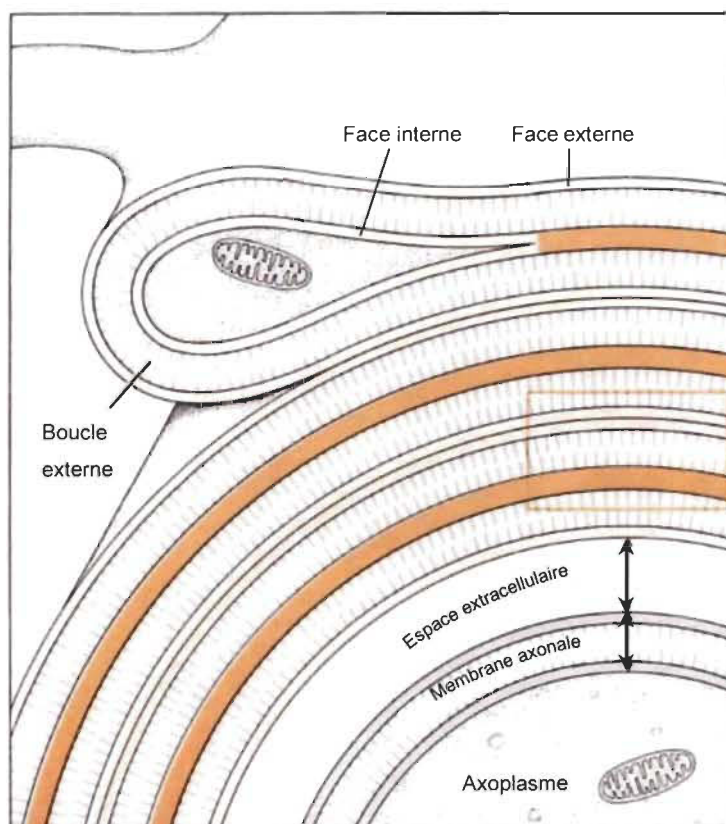


Figure 1.2. Enroulement de la myéline. La fusion des faces internes est schématisée en orange. Les faces externes ne font que s'accoter l'une sur l'autre. Schéma tiré de Morell et Norton (1980)

volume de cytoplasme entre les faces membranaires internes de la myéline est réduit (Hartline & Colman, 2007). Cette réduction augmente la capacité isolante de la gaine de myéline (Hartline & Colman, 2007). Cette compaction serrée est possible grâce à la forte concentration de MBP (Nave & Werner, 2014). La MBP possède une forte affinité avec les phospholipides, en particulier le phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂), des membranes cellulaires des oligodendrocytes, ce qui permet l'adhésion des membranes ensemble (Nave & Werner, 2014). L'absence de MBP empêche la compaction de la spirale de la gaine de myéline, laissant les gaines de myéline lâches autour des axones (Roach, Takahashi, Pravtcheva, Ruddle, & Hood, 1985). La protéine de MBP étant nécessaire à la compaction de la myéline, elle est présente dans toutes les fibres myélinisées. Puisqu'elle fait partie des protéines les plus abondantes de la myéline (Jahn et al., 2009; Nave & Werner, 2014), elle est un bon marqueur pour voir les fibres myélinisées. Dans cette étude, la MBP va donc être utilisée pour rendre visibles les gaines de myéline.

Fonctions

La myéline joue un rôle dans la vitesse de conduction des axones, la synchronisation entre les aires corticales, l'intégration neuronale, le métabolisme et la plasticité des axones (Gibson et al., 2014; Pajevic et al., 2014).

Vitesse, synchronisation et intégration neuronale

Les axones corticocorticaux n'ont pas tous la même distance à parcourir pour se rendre à différents cortex cibles (Harris et al., 2019). De plus, certains doivent aussi traverser le corps calleux (Olavarria et al., 2012). Malgré cette différence de longueur, certains signaux doivent

être synchronisés entre les aires corticales afin que l'intégration neuronale soit optimale (Seidl, 2014). Afin de compenser pour les trajectoires à parcourir de distances inégales, la vitesse de conduction des axones peut être modulée. La vitesse de conduction d'un axone peut être augmentée de deux façons : par l'accroissement de son diamètre ou par l'ajout d'une gaine de myéline (Hartline & Colman, 2007).

En l'absence d'une gaine de myéline, la vitesse de conduction d'un axone augmente avec la racine carrée de son diamètre (Figure 1.3). C'est-à-dire qu'un diamètre axonal passant de 0,5 à 1 μm (Figure 1.3) va entraîner un changement de vitesse de conduction de 1,5 à 2 ms^{-1} , alors que la vitesse de conduction d'un axone myélinisé augmente linéairement avec son diamètre (Figure 1.3) (Wen & Chklovskii, 2010). Pour un axone myélinisé, le changement d'un diamètre axonal de 0,5 à 1 μm double la vitesse de conduction de 3 à 6 ms^{-1} (Figure 1.3).

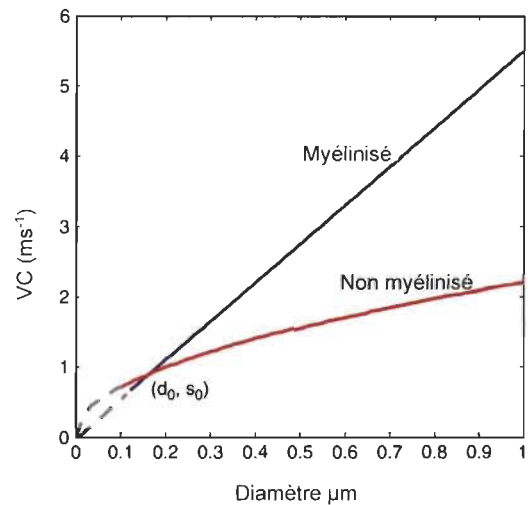


Figure 1.3. Augmentation de la vitesse de conduction pour des axones myélinisés et non myélinisés en fonction du diamètre de l'axone. Adapté de Wen et Chklovskii (2010)

Pour augmenter la vitesse de conduction, le diamètre des axones non myélinisés doit augmenter considérablement, menant ainsi aux axones géants des céphalopodes (calmars) (Hartline & Colman, 2007). Ces axones géants peuvent atteindre un diamètre de 0,5 à 1 mm et permettre une vitesse de conduction de 25 ms^{-1} (Salzer & Zalc, 2016). Étant donné que les axones géants prennent beaucoup d'espace, la limitation du volume de la boîte crânienne ne

permettait pas cette solution chez les vertébrés (Hartline & Colman, 2007; Salzer & Zalc, 2016; Zalc, 2016).

Un axone myélinisé possède de courts segments dépourvus de gaine de myéline, les nœuds de Ranvier (Hartline & Colman, 2007), qui permettent les échanges d'ions avec le milieu extracellulaire (Bear et al., 2016; Salzer & Zalc, 2016). Dans un axone myélinisé, la membrane axonale aux nœuds de Ranvier est pourvue de canaux voltage-dépendants (Bear et al., 2016; Salzer & Zalc, 2016). Ces canaux sont activés quand l'influx nerveux arrive et entraîne une différence de potentiel entre les milieux intra- et extracellulaires (Bear et al., 2016). Les segments myélinisés ne possèdent pas ces canaux voltage-dépendants (Bear et al., 2016; Salzer & Zalc, 2016). Grâce à l'isolation électrique procurée par la gaine de myéline, la dépolarisation intracellulaire se propage rapidement, sans se dégrader, dans les segments myélinisés (Bear et al., 2016; Luo, 2016). C'est ce qui est appelé la conduction saltatoire, puisque l'influx nerveux donne l'impression de « sauter » d'un nœud de Ranvier à l'autre (Figure 1.4).

Certains signaux doivent arriver en même temps dans différents cortex. En modifiant la vitesse de conduction, la myéline permettrait une meilleure synchronisation entre les aires corticales. Puisque les distances entre les aires corticales diffèrent, les délais temporels de l'influx nerveux seront aussi différents. La myéline permet d'ajuster la vitesse de conduction pour que ces aires corticales puissent recevoir le signal en même temps malgré les différences de distances (Salami, Itami, Tsumoto, & Kimura, 2003).

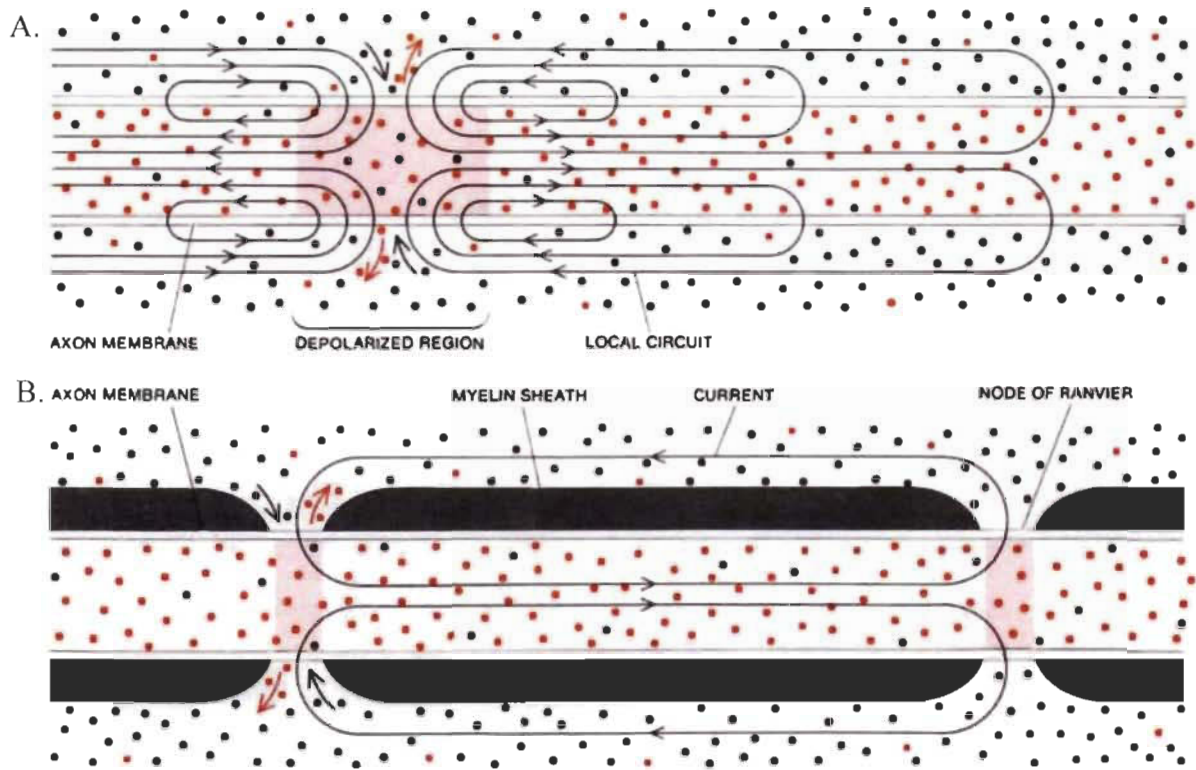


Figure 1.4. Conduction saltatoire. Les ions de Na^+ sont les points noirs et de K^+ sont les points orange. A. La conduction de l'influx nerveux dans un axone non myélinisé. B. La conduction saltatoire dans un axone myélinisé. La gaine de myéline empêche les ions de sortir par la membrane de l'axone. Seuls les nœuds de Ranvier possèdent les canaux voltage-dépendant de Na^+ et K^+ , permettant la dépolarisation de l'axone. Les charges vont diffuser dans l'axone jusqu'au prochain nœud de Ranvier. Le signal saute donc d'un nœud de Ranvier à un autre dans un axone myélinisé. Schéma tiré de Morell et Norton (1980)

Tous les signaux ne doivent pas nécessairement arriver en même temps. Certains signaux doivent être synchronisés, alors que d'autres pourraient devoir arriver plus tard pour permettre une bonne intégration de l'information. Il est donc nécessaire que la vitesse de conduction soit optimale et non pas la plus rapide possible (Pajevic et al., 2014). Cette nécessité de vitesse optimale pourrait expliquer les zones exemptes de gaine de myéline dans certains axones myélinisés. Certains axones myélinisés montrent une distribution intermittente de la myéline (Tomassy et al., 2014). En effet, ils possèdent des zones sans myéline plus longues que les nœuds de Ranvier, jusqu'à $55 \mu\text{m}$ (Tomassy et al., 2014). Cette distribution intermittente pourrait permettre des connexions synaptiques sur la membrane axonale dépourvue de myéline

(Tomassy et al., 2014). De plus, cette distribution intermittente de la myéline pourrait servir à introduire des retards dans la propagation de l'influx nerveux, d'environ 2 ms par millimètres non myélinisés (Thomson & Bannister, 2003). Ces retards permettraient que l'information transmise soit intégrée aux bons endroits, aux bons moments (Thomson & Bannister, 2003).

Certains neurones du cortex visuel primaire sont synchronisés entre eux (Ishikawa, Komatsu, & Yoshimura, 2018). Puisque VI possède des neurones synchronisés ensemble, il pourrait être supposé que les axones visuels calleux et ipsilatéraux auraient besoin d'être synchronisés. Puisque les axones calleux parcourent une plus grande distance que les axones ipsilatéraux, leur vitesse de conduction devrait être plus grande (Seidl, 2014; Zhang et al., 2019). Il pourrait être supposé que les axones calleux auraient plus tendance à être myélinisés que les axones ipsilatéraux, puisque la myéline augmente la vitesse de conduction d'un axone (Hartline & Colman, 2007).

Myéline et économie métabolique

La myéline permettrait une économie d'énergie par les neurones puisqu'elle permet de diminuer le nombre de canaux-voltage dépendant. L'influx nerveux a alors seulement besoin d'activer les canaux présents dans les nœuds de Ranvier (Nave, 2010). Ainsi, en limitant les pertes de sodium et de potassium, moins d'énergie est requise par l'activation des pompes ioniques afin de rétablir les équilibres ioniques (Harris & Attwell, 2012). Au cours de la vie de l'animal, l'économie d'énergie procurée par la myélinisation des axones dépasserait les coûts de fabrication de la myéline et serait donc rentable énergétiquement (Harris & Attwell, 2012). Cependant, le maintien de la myéline entraîne également un coût métabolique (Harris & Attwell, 2012). Lorsque le coût de maintien est pris en considération, les gains et dépenses énergétiques

s'égaliseraient (Harris & Attwell, 2012). Ainsi, l'hypothèse que la myéline économise l'énergie est mise en doute par certains auteurs (Harris & Attwell, 2012).

Plasticité

La myélinisation des axones n'est pas statique dans le SNC, elle est plastique (Gibson et al., 2014; Nave, 2010; Purger et al., 2016). Elle va donc changer selon les stimuli environnementaux reçus durant la vie de l'animal. Par exemple, la privation tactile, par le sectionnement des vibrisses chez la souris, diminue l'épaisseur des gaines de myéline ainsi que le nombre de fibres myélinisées dans le cortex somatosensoriel (Barrera et al., 2013). L'isolement social est un autre exemple d'une diminution de l'activité des axones causant une diminution de l'épaisseur de la gaine de myéline dans le cortex préfrontal (Liu et al., 2012). La gaine de myéline va donc épaissir ou diminuer en fonction des niveaux d'activité dans les neurones (Barrera et al., 2013; Gibson et al., 2014; Nave & Werner, 2014). De plus, des axones préalablement non myélinisés peuvent le devenir avec une activité cérébrale accrue, comme lors d'un apprentissage moteur (McKenzie et al., 2014).

La myéline peut aussi agir comme un frein à la plasticité des axones (Grados-Munro & Fournier, 2003). En effet, certaines protéines de la myéline : la glycoprotéine associée à la myéline (MAG), la glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes (OMgp), et la protéine de la myéline inhibitrice de croissance neuronale (Nogo) empêcheraient la régénération des axones après une blessure (Grados-Munro & Fournier, 2003). Ces protéines auraient des effets inhibiteurs de la croissance seulement sur les axones matures, alors qu'elles favoriseraient la croissance des axones embryonnaires (Grados-Munro & Fournier, 2003). La myéline du SNC et du SNP ne posséderaient pas les mêmes protéines inhibitrices. La protéine MAG aurait un

fort rôle inhibiteur dans le SNP, mais moindre dans le SNC (Grados-Munro & Fournier, 2003). La myéline serait donc un effet inhibiteur sur la croissance des axones, empêchant une surcroissance néfaste des axones. Par exemple, l'inhibition de la protéine associée à la myéline NI-35/250, qui est une protéine inhibitrice de la régénération des axones, provoque la surcroissance des neurones de Purkinje dans le cervelet (Buffo et al., 2000). Cette protéine maintiendrait alors le bon ciblage des terminaisons nerveuses dans la matière grise (Buffo et al., 2000). Cette boucle de rétrocontrôle basé sur l'inhibition de la croissance des axones causée par la myéline protégerait le cerveau de mauvaises connexions axonales.

Facteurs déterminant la myélinisation

Le processus de myélinisation des axones est complexe. Il dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont : le développement, le diamètre des axones, l'activité cérébrale ainsi que les états pathogènes.

Développement

La myélinisation commence par la prolifération et la division des précurseurs des oligodendrocytes (Oligodendrocyte precursor cells, OPC). Ces cellules peuvent proliférer autant pendant le développement qu'à l'âge adulte. Ensuite, la gaine de myéline va se former sur les axones. Les OPCs vont proliférer en se divisant et se différencier en oligodendrocytes. Les oligodendrocytes sont différenciés majoritairement durant la période postnatale, c'est-à-dire les quatre premières semaines chez la souris (Snaidero & Simons, 2017). La vitesse de différenciation des OPCs diminue avec l'âge adulte, mais ils continuent tout de même leur différenciation (Snaidero & Simons, 2017). La myélinisation serait divisée en deux modes, soit

la méthode de base dans la phase développementale et la méthode ciblée chez la souris adulte (Snaidero & Simons, 2017).

La myélinisation de base chez la souris s'effectue durant le développement du cerveau où beaucoup d'axones doivent être myélinisés rapidement (Snaidero & Simons, 2017). Pour répondre à ce besoin, les OPCs seraient surproduits (Calver et al., 1998). Par la suite, les OPCs en surplus subirait l'apoptose cellulaire, ramenant les quantités d'OPCs à la normale présente dans le cerveau adulte (Calver et al., 1998).

Chez l'adulte, la myélinisation est ciblée (Snaidero & Simons, 2017). La prolifération des OPCs continue dans le cerveau adulte (Young et al., 2013), mais la différenciation des OPCs serait plutôt contrôlée directement par les neurones (Snaidero & Simons, 2017). Deux hypothèses existent sur la modulation des OPCs dans le cerveau adulte. Premièrement, les OPCs se différencieraient directement en oligodendrocytes, sans prolifération (Hughes, Kang, Fukaya, & Bergles, 2013). Les OPCs voisins proliféreraient donc pour combler l'espace laissé par l'OPC se différenciant (Hughes et al., 2013). Deuxièmement, les OPCs seraient connectés synaptiquement avec les axones, ce qui leur permettrait de recevoir les neurotransmetteurs et de connaître directement les besoins de myélinisations des axones (Gallo et al., 1996; Gibson et al., 2014; Hamilton et al., 2017).

La myéline se développe rapidement dans les cerveaux juvéniles et ralentit dans les cerveaux adultes. Les axones myélinisés peuvent varier entre les individus selon leurs âges ainsi que leur historique de vie.

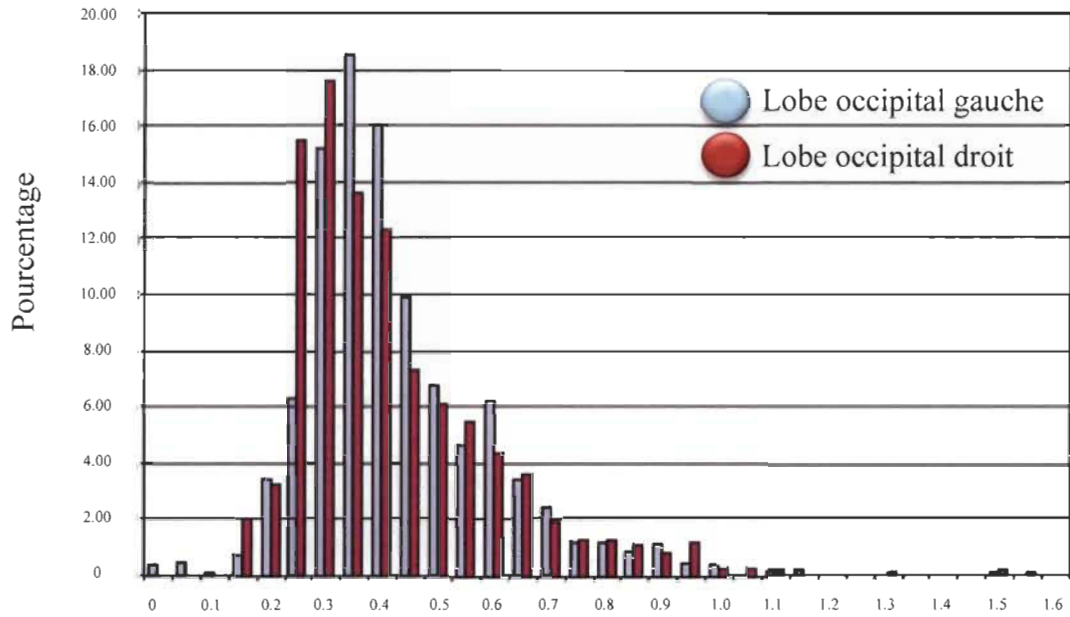
Diamètre des axones

Le diamètre des axones peut influencer la myélinisation par les cellules gliales. L'influence de la taille varie selon les cellules gliales. Il n'est donc pas le même pour le SNP et le SNC.

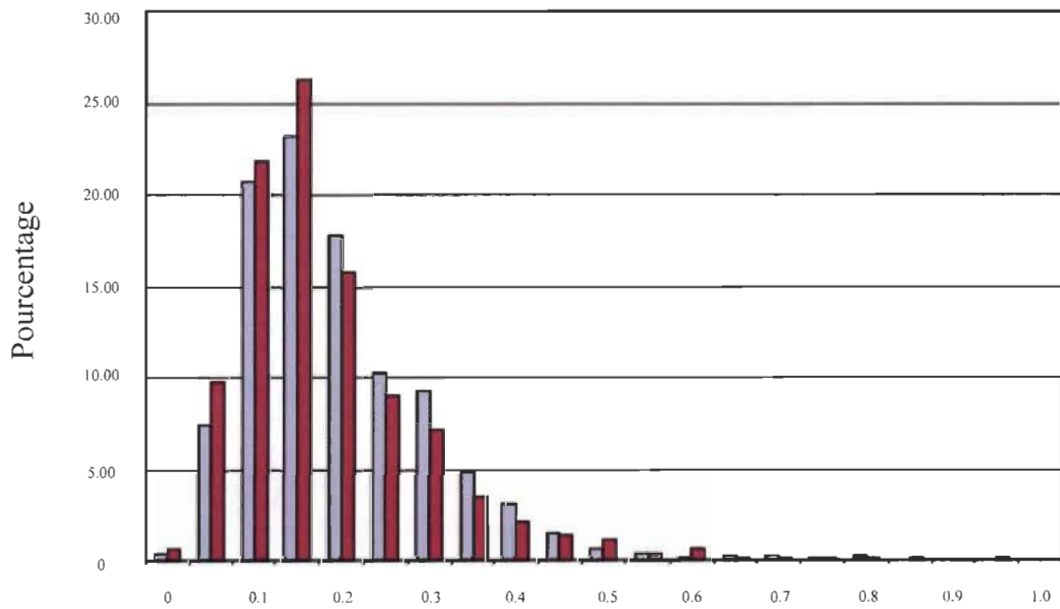
Dans le SNP, les axones plus petits que $1,5 \mu\text{m}$ ne sont pas myélinisés alors que les axones plus gros que $1,5 \mu\text{m}$ le sont (Duncan, 1934). Les axones du SNP excrètent une protéine, la neuréguline 1, qui cause leurs myélinisations (Klingseisen & Lyons, 2018). La neuréguline 1 est présente en grande quantité dans les axones de calibre plus gros que $1,5 \mu\text{m}$ (Taveggia et al., 2005). Son absence empêche la myélinisation de se produire (Taveggia et al., 2005). C'est pourquoi les cellules de Schwann ne peuvent myéliniser des axones inertes (Klingseisen & Lyons, 2018).

Dans le SNC, la relation entre le diamètre des axones et leur myélinisation est moins claire puisqu'il existe des axones de faibles diamètres entre $0,2$ et $0,8 \mu\text{m}$ qui peuvent ou non être myélinisés in vivo (Figure 1.5) (Partadiredja et al., 2003; Snaidero & Simons, 2017). Cependant, les axones au-dessus de $1 \mu\text{m}$ tendent à être tous myélinisés (Partadiredja et al., 2003). De plus, contrairement aux cellules de Schwann, les oligodendrocytes peuvent myéliniser des axones inertes (des axones synthétiques ou morts, n'ayant aucune activité neuronale possible) à partir d'un diamètre de $0,4 \mu\text{m}$. Le diamètre de l'axone est un critère pour la myélinisation dans le SNC, mais, in vivo, il serait modulé par d'autres facteurs, créant ainsi un chevauchement de diamètre des axones myélinisés (Klingseisen & Lyons, 2018; Sturrock, 1980). Puisqu'il existe un chevauchement des diamètres des axones myélinisés et non myélinisés, des petits axones corticocorticaux visuels de la souris pourraient être myélinisés.

A. Axones myélinisés



B. Axones non myélinisés



Diamètre des axones

Figure 1.5. Pourcentage des axones myélinisés et non myélinisés de différents diamètres dans la matière blanche du lobe occipital. Les données proviennent de six rats. Diamètres des axones myélinisés en A et non myélinisés en B. Adapté de Partadiredja, Miller, et Oorschot (2003).

Activité cérébrale

L'activité cérébrale peut venir modifier la myélinisation des axones (Gibson et al., 2014). Lors d'un apprentissage, des axones préalablement non myélinisés, dans le corps calleux, peuvent le devenir lorsqu'ils deviennent plus actifs (McKenzie et al., 2014). De plus, une stimulation optogénétique des neurones de la couche V du cortex prémoteur augmenterait la prolifération et la différenciation des OPCs ainsi que l'épaisseur de la gaine de myéline dans le cortex préfrontal, la matière blanche sous-corticale et le corps calleux chez la souris (Gibson et al., 2014). Pour ce faire, les neurones doivent influencer les précurseurs d'oligodendrocytes à l'aide de neurotransmetteurs. Trois neurotransmetteurs bien connus influencent la prolifération et la différenciation des OPCs soit l'ATP (Stevens, Porta, Haak, Gallo, & Fields, 2002), le glutamate (Gallo et al., 1996) et le GABA (Hamilton et al., 2017).

L'ATP, produite par les axones lors d'un influx nerveux, inhibe la prolifération des OPCs et stimule leur différenciation en oligodendrocytes myélinisateurs (Stevens et al., 2002). Au contraire de l'ATP, la prolifération et la différenciation des OPCs sont inhibées par le relâchement de glutamate (Gallo et al., 1996) et de GABA (Hamilton et al., 2017). L'effet des différents neurotransmetteurs sur la myélinisation pourrait changer selon le type de neurones de l'axone myélinisé. Des axones très actifs seraient plus propices à la myélinisation.

État pathogène

La démyélinisation des axones est observée dans plusieurs maladies, dont la sclérose en plaques (MS) (Rohkamm, 2014). La MS cause de graves problèmes de santé, dont la démence, la perte de coordination motrice, des changements comportementaux, de la douleur, ainsi que des pertes motrices et visuelles (Rohkamm, 2014). La MS est caractérisée par la présence de

plaques blanches en imagerie par résonnance magnétique (IRM) dénotant la perte de myéline (Lucchinetti et al., 2000). Le système immunitaire phagocyte les gaines de myéline, ce qui crée les plaques observables en IRM (Rohkamm, 2014). La MS inhiberait aussi la différenciation des précurseurs des oligodendrocytes, ce qui contribuerait à la progression de la maladie (Deshmukh et al., 2013).

La gaine de myéline est perdue en plaques plus ou moins bien définies sur les axones (Lucchinetti et al., 2000). C'est-à-dire que plusieurs axones proches vont être touchés par les lésions de la MS. Ces lésions peuvent toucher plusieurs structures comme le cortex cérébral, le cervelet, le tronc cérébral (Höftberger & Lassmann, 2017) ainsi que les cortex frontaux, les cortex temporaux, le corps calleux, les cortex pariétaux et les régions périventriculaires (Calabrese & Castellaro, 2017; Lucchinetti et al., 2000). Les lésions de la matière grise peuvent être subpiales, intracorticales ou chevaucher la matière blanche (Höftberger & Lassmann, 2017). Des lésions peuvent être présentes jusqu'à la couche 3 des cortex touchés (Calabrese & Castellaro, 2017).

Malgré toutes les recherches sur la remyélinisation des axones (Bove & Green, 2017), la nature des axones touchés par la MS demeure largement inconnue. Les cortex touchés par la MS dans le SNC, comme les cortex sensoriels, moteurs et frontaux, sont connus (Calabrese & Castellaro, 2017; Lucchinetti et al., 2000), mais l'identité des axones qui subissent la perte de leur myéline est encore inconnue. Pour savoir quels axones sont démyélinisés par une maladie comme la MS, il serait important de connaître la nature des axones myélinisés dans les conditions normales.

Myéloarchitecture

Les aires corticales se distinguent par leur myéloarchitecture (Figure 1.6), c'est-à-dire par des différences de densité et d'orientation des fibres myélinisées dans les couches corticales (Nieuwenhuys, Broere, & Cerliani, 2015). Deux orientations de fibres myélinisées existent. Les fibres orientées radialement (se dirigeant vers la surface piaie) et tangentiellement (orienté parallèlement à la surface piaie) (Figure 1.6). Les fibres radiales se regroupent souvent en faisceaux qui peuvent aller jusqu'à la surface piaie, mais se terminent généralement dans les couches 2-3 (Nieuwenhuys et al., 2015). Les fibres tangentielles peuvent former des bandes horizontales (Nieuwenhuys et al., 2015). Ces bandes peuvent être plus ou moins épaisses selon le cortex. Très peu de fibres possédant d'autres orientations sont présentes dans le cortex, autant humain que souris (Zilles et al., 2016).

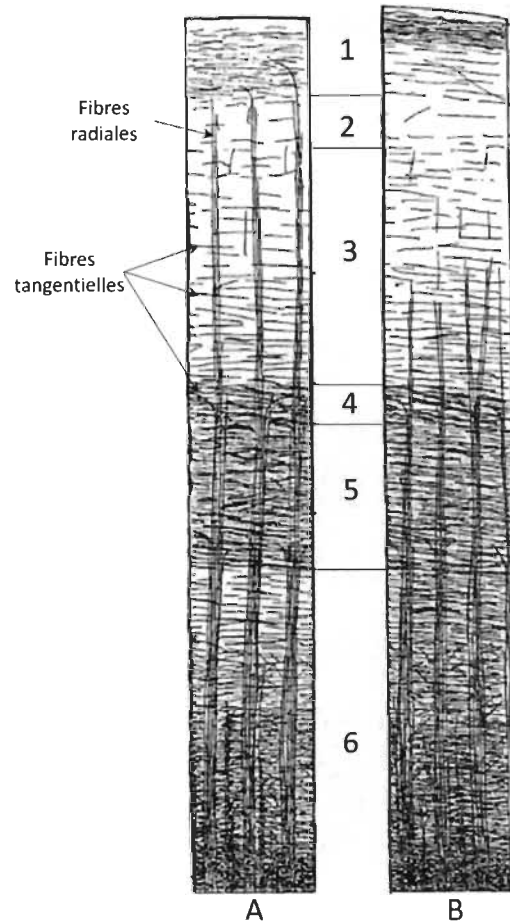


Figure 1.6. Schéma des fibres myélinisées tangentielles et radiales. A. Les fibres radiales se terminent dans la couche 2. B. Les fibres radiales se terminent dans la couche 3. Adapté de Nieuwenhuys (2013).

En général, la densité des fibres myélinisées augmente avec la profondeur des couches (Figure 1.7) (Redlich & Lim, 2019; Zilles et al., 2016). La couche 1, chez le rongeur, possède une bande de fibres myélinisées tangentiellles ressemblant à la strie d'Exner chez l'humain (Redlich & Lim, 2019; Zilles et al., 2016). Les fibres myélinisées des couches 2-3 possèdent principalement une orientation radiale (Figure 1.7Figure 1.) (Redlich & Lim, 2019; Zilles et al., 2016). Ces fibres radiales sont plus dispersées dans les couches 2-3 pour se regrouper plus densément en faisceaux dans les couches 4-6 (Redlich & Lim, 2019). La couche 4 de V1 chez le rongeur est moins différenciée que chez l'humain (Zilles et al., 2016). Les fibres myélinisées possèdent les deux orientations dans les couches 5-6 (Figure 1.7) (Zilles et al., 2016). La matière blanche est constituée de nombreuses fibres myélinisées orientées tangentiellement.

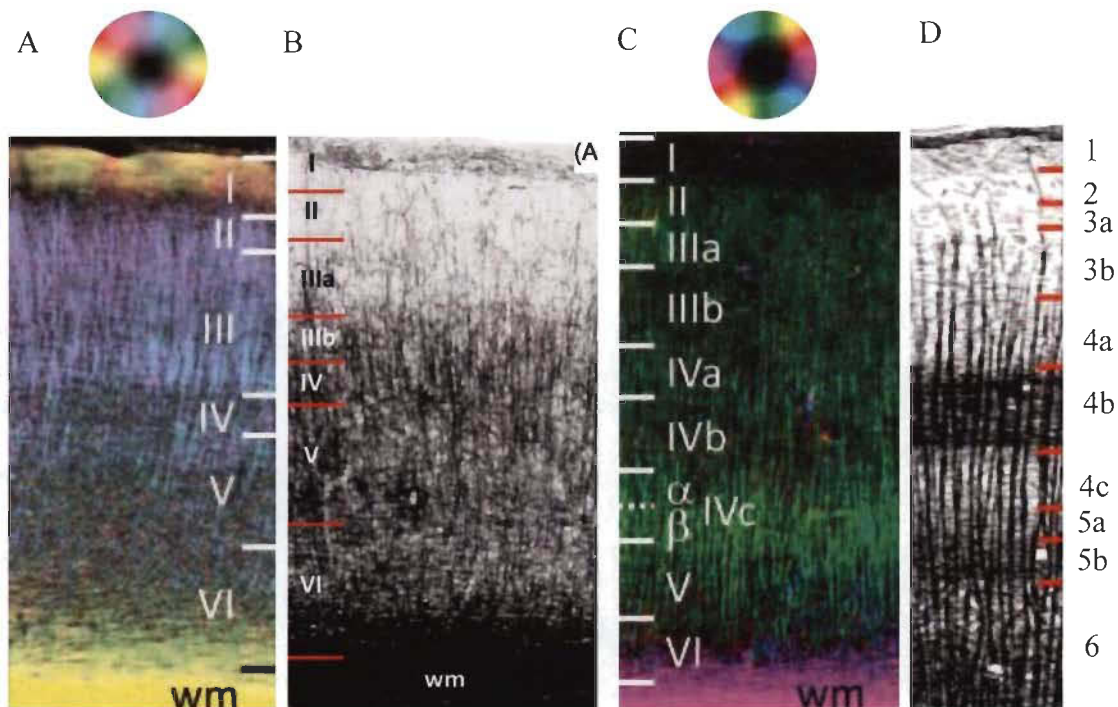


Figure 1.7. Comparaison de la myéloarchitecture du cortex visuel du rat et de l'humain. A-B. cortex visuel du rat pour A. orientation des fibres et B. myéloarchitecture. C-D. cortex visuel de l'humain pour C. orientation des fibres et D. myéloarchitecture. Les chiffres romains sont utilisés pour délimiter les couches déterminées avec la cytoarchitecture et les chiffres arabes pour les myéloarchitecture. Les pastilles de couleur indiquent l'orientation des fibres colorés. Adapté de Zilles et al. (2016).

Puisque des fibres myélinisées de la couche 5-6 possèdent une orientation tangentielle (Zilles et al., 2016), celles-ci pourraient assurer une connectivité avec les autres aires corticales (Turner, 2019). Puisque les axones corticocorticaux ipsilatéraux de la souris cheminent dans la couche 5-6 de la matière grise (Massé, Régnier, & Boire, 2016; Watakabe & Hirokawa, 2018), l'hypothèse de leur myélinisation peut être posée. Les axones corticocorticaux ipsilatéraux du cortex visuel font-ils partie des fibres myélinisées tangentielles observées dans la myéloarchitecture? Contrairement aux axones corticocorticaux ipsilatéraux, les axones corticocorticaux controlatéraux chemineraient principalement dans la matière blanche (Watakabe & Hirokawa, 2018). Ces différences de chemins amènent à se demander s'il existe une différence de myélinisation entre les axones ipsilatéraux et controlatéraux du cortex visuel.

Identité des axones myélinisés

Connaitre l'identité des axones myélinisés est nécessaire pour mieux saisir les rôles de la myéline et mieux comprendre les maladies liées à la démyélinisation. Malgré la possibilité de combiner le traçage axonal et la révélation de la myéline, très peu d'études l'ont fait (Hoogland, Wouterlood, Welker, & Loos, 1991; Osanai et al., 2017; Tomassy et al., 2014). Cette combinaison permet de savoir l'origine des axones myélinisés. Un survol des connaissances sur l'identité des axones myélinisés va être fait dans cette section.

Interneurones

Il a été démontré que les interneurones GABAergiques parvalbumines positifs (PV+) sont généralement myélinisés dans le cortex et les régions sous-corticales chez plusieurs espèces (souris, rats, chats, singes et humains) (Stedehouder et al., 2017; Stedehouder & Kushner, 2017).

La myélinisation de ces neurones serait conservée entre les espèces (Stedehouder & Kushner, 2017). Ces observations ont été faites dans différentes régions sous-corticales soit : les collicules supérieurs (chat) (Mize, 1988), le noyau rouge (singe) (Ralston & Milroy, 1992), le noyau hypoglosse (singe) (Takasu, Nakatani, Arikuni, & Kimura, 1987), le striatum (rat) (Kita, Kosaka, & Heizmann, 1990), les collicules inférieurs (rat) (Roberts & Ribak, 1987), le claustrum (humain) (Hinova-Palova et al., 2014) et l'hippocampe (rat, humain, souris) (Katsumaru, Kosaka, Heizmann, & Hama, 1988; Seress et al., 1993; Stedehouder et al., 2017). Pour les régions corticales, des observations des interneurons GABAergiques PV+ ont été faites dans les cortex occipitaux (rat) (Peters & Proskauer, 1980), somatosensoriels (souris) (Micheva et al., 2016), entorhinaux (rat) (Wouterlood, Härtig, Brückner, & Witter, 1995) et frontaux (humain) (Chung et al., 2013). La majorité de ces observations sont des observations ponctuelles. Pour une revue de littérature complète sur le sujet, voir le Tableau 2 issu de Stedehouder et Kushner (2017).

Une étude sur le cortex somatosensoriel de la souris a démontré clairement qu'une grande portion de la myéline corticale, soit entre 25 à 50 %, provient des interneurons GABAergiques PV+ (Micheva et al., 2016). La plus grande proportion, environ 50 %, de la myéline provenant des interneurons GABAergiques PV+ est dans la couche 2-3 (Figure 1.8) (Micheva et al., 2016). La proportion diminue jusqu'à être de 5 à 15 % des axones myélinisés dans la couche 5-6 (Figure 1.8) (Micheva et al., 2016). L'identité des axones myélinisés, autres que les interneurons GABAergiques, n'a pas encore été étudiée. Il est supposé que ce seraient des axones glutamatergiques excitateurs de longue distance (Micheva et al., 2016).

L'étude des axones GABAergique est importante, car leur démyélinisation jouerait un rôle dans la schizophrénie. En effet, les patients atteints de schizophrénie démontrent des anomalies dans la matière blanche, la dysfonction des interneurons ainsi que des anomalies dans la myéline. La dysfonction des interneurons et les anomalies de la myéline ont été avancées séparément. Cependant, ils ne peuvent expliquer tous les problèmes cognitifs engendrés par la schizophrénie. La myélinisation des interneurons propose un modèle englobant les anomalies observées sur la myéline et les interneurons. Pour avoir une revue de littérature complète, lire Stedehouder et Kushner (2017).

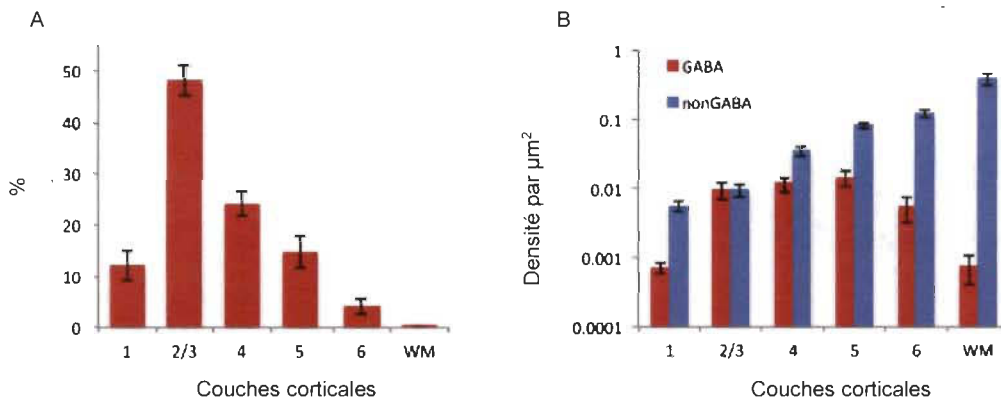


Figure 1.8. Densité des axones myélinisés GABAergiques du cortex somatosensoriel de la souris. A. Pourcentage de fibres myélinisées GABAergique dans les différentes couches corticales. B. Logarithme de la densité en μm^2 d'axones GABAergiques et non GABAergiques dans les différentes couches corticales. Moyenne provenant de 3 souris. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. Proviens de Micheva et al. (2016)

Axones corticocorticaux

Il n'y a pas d'études qui combinent le traçage des axones et la révélation de la myéline de connexions entre les aires corticales. Chez l'humain, les fibres en U, les axones formant des connexions corticocorticales entre gyri adjacents, sont myélinisées (Turner, 2019). Nous posons donc ici la question à savoir si les axones corticocorticaux chez la souris sont aussi myélinisés.

L'étude de Tomassy et al. (2014) est une des rares qui montre la myélinisation d'axones individuels chez la souris. Ils ont suivi des axones de neurones pyramidaux glutamatergiques en microscopie électronique à partir du soma sur des distances de 200 μm . Puisqu'ils n'ont pas fait de traçage, ils ne pouvaient pas suivre les axones sur une plus grande distance. Certains de ces axones myélinisés provenaient des couches II à V du cortex somatosensoriel et du cortex visuel (Tomassy et al., 2014). Ils ont trouvé des axones complètement myélinisés, non myélinisés et myélinisés de façon intermittente. Bien qu'il n'y ait pas de preuves, Tomassy et al. (2014) indiquent que les axones non myélinisés qu'ils ont observés pourraient être des axones calleux non myélinisés. Ce mélange d'axones myélinisés et non myélinisés pourrait comprendre des axones corticocorticaux visuels.

Corps calleux

Les axones du corps calleux permettent la connexion entre les hémisphères cérébraux (Olavarria & Van Sluyters, 1983). Le corps calleux possède majoritairement des axones myélinisés, mais aussi des axones non myélinisés (Partadiredja et al., 2003; Sturrock, 1980). La proportion d'axones non myélinisés dans le corps calleux est supérieure chez la souris que chez le chat et les primates. Les souris possèdent environ 46 % de leurs axones qui sont non myélinisés dans le corps calleux, alors que les chats en ont 40 % et les primates environ 10 % (Partadiredja et al., 2003). Il est donc beaucoup plus probable de trouver des axones non myélinisés chez la souris. Certains neurones du cortex visuel envoient des axones corticocorticaux dans le corps calleux (Blakemore, Diao, Pu, Wang, & Xiao, 1983; Olavarria & Montero, 1989; Olavarria & Van Sluyters, 1983; Zhang et al., 2019). Ces axones contralatéraux pourraient être composés d'un mélange d'axones myélinisés et non myélinisés (Partadiredja et

al., 2003; Sturrock, 1980). Comme les axones non myélinisés ont tendance à être groupés ensemble dans la matière blanche (Partadiredja et al., 2003), il se peut que des faisceaux d'axones non myélinisés soient aperçus.

Des axones corticocorticaux provenant du cortex somatosensoriel de la souris ont été observés dans le corps calleux. En effet, une des rares études combinant le traçage d'axone et la visualisation de la myéline a tracé les axones provenant du cortex somatosensoriel à l'aide d'un virus et du Phal (Osanai et al., 2017). Ils ont trouvé des axones myélinisés dans le corps calleux provenant du cortex somatosensoriel. Puisque des axones calleux somatosensoriels ont déjà été observés, il se pourrait que des neurones calleux visuels possèdent aussi des axones myélinisés.

Structures sous-corticales

Une étude a trouvé des axones cortico-thalamiques myélinisés (Hoogland et al., 1991). Après une injection du traceur antérograde, la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* dans le champ de tonneau de la souris, une étude ultrastructurale a permis de révéler la présence d'axones myélinisés marqués par le Phal d'un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 μm dans la capsule interne (Hoogland et al., 1991). Ils ont aussi observé quelques axones myélinisés d'environ 0,8 μm dans le noyau ventro-basal thalamique, mais la majorité des axones marqués étaient de petits calibres (jusqu'à 0,5 μm) et non myélinisés (Hoogland et al., 1991). Le noyau postérieur du thalamus avait un mélange d'axones myélinisés et non myélinisés. Les axones myélinisés et marqués par le Phal avaient une gaine de myéline relativement mince, avec 5-8 lamelles (Hoogland et al., 1991). Cependant, les axones myélinisés qu'ils ont observés ne sont pas illustrés dans leur publication. Ce ne sont donc pas toutes les structures sous-corticales qui possèdent des axones myélinisés.

En résumé, bien qu'une grande proportion de la myéline corticale entoure des axones de neurones GABAergiques PV+ (Micheva et al., 2016; Stedehouder et al., 2017), il y a des évidences que des neurones glutamatergiques corticaux possèdent eux aussi des axones myélinisés. Chez la souris, quelques études ont démontré des axones corticocorticaux myélinisés provenant du cortex somatosensoriel (Osanai et al., 2017; Tomassy et al., 2014). Des axones myélinisés de neurones pyramidaux ont aussi été trouvés dans le cortex visuel primaire (Tomassy et al., 2014). Il pourrait alors être possible que les axones visuels corticocorticaux soient myélinisés.

Connectivité corticale visuelle

Puisque le cortex visuel primaire est bien connu et très étudié, il est un bon point de départ pour vérifier d'où provient la myéline dans le néocortex. De plus, la présence de neurones pyramidaux, possédant des axones myélinisés près du soma, fait du cortex visuel primaire un bon candidat pour vérifier si ses connexions corticocorticales sont myélinisées sur de plus longues distances (Tomassy et al., 2014).

Le cortex visuel primaire (V1) entretient des connexions réciproques avec environ neuf aires extrastriées : POR, P, LI, LM pour la voie ventrale et PM, RL, AL et A pour la voie dorsale (Figure 1.9) (Olavarria & Montero, 1989; Wang et al., 2012). La voie ventrale est plutôt dédiée à la reconnaissance des objets alors que la voie dorsale est plus réceptive à la perception spatiale (Wang et al., 2012). Anatomiquement, les connexions efférentes de V1 sont des connexions de type « feedforward », alors que les connexions partant des aires extrastriées et allant à V1 sont des connexions de type « feedback ». Chez le rongeur, les connexions « feedforward » finissent dans toutes les couches des aires extrastriées alors que les connexions « feedback » évitent généralement la couche 4 (Coogan & Burkhalter, 1990).

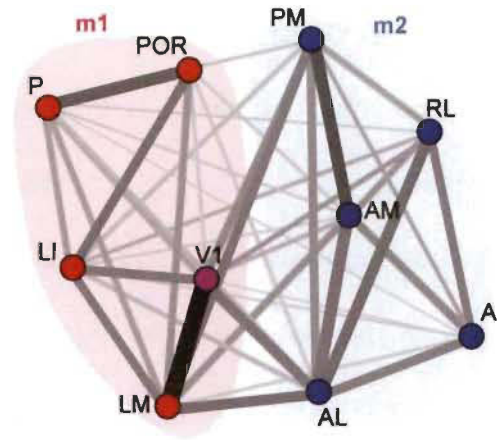


Figure 1.9. Réseau de connectivité de V1. En rouge : les aires extrastriées de la voie ventrale et en bleu, celles de la voie dorsale (Wang, Sporns, & Burkhalter, 2012).

Objectifs

L'objectif de cette recherche est de déterminer si les axones efférents ipsilatéraux et controlatéraux du cortex visuel primaire vers ses cibles corticales sont myélinisés chez la souris. Étant donné qu'il est accepté que la matière grise possède moins d'axones myélinisés que la matière blanche et que les axones ipsilatéraux de la souris cheminent principalement dans la matière grise, alors que les axones controlatéraux cheminent principalement dans la matière blanche (Watakabe & Hirokawa, 2018), nous nous attendons à avoir une proportion plus élevée d'axones myélinisés controlatéraux qu'ipsilatéraux. Nous nous attendons donc à ce que les

axones ipsilatéraux soient majoritairement non myélinisés et que les axones controlatéraux soient majoritairement myélinisés.

Pour ce faire, un traceur antérograde, la leucoagglutinine du *Phaseolus vulgaris*, sera injecté dans le cortex visuel primaire de souris adultes. Ces injections combinées à l'immunohistochimie de la MBP permettront de déterminer la myélinisation des axones corticocorticaux efférents du cortex visuel primaire. Les injections vont être observées au microscope optique confocal. Pour confirmer les résultats, de la microscopie électronique va être effectuée sur la matière blanche.

Chapitre 2 Méthodologie

Animaux

Toutes les manipulations ont été approuvées par le Comité de Bons Soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Les souris sont hébergées en groupe habituellement de 4 souris. Elles ont de l'eau fraîche à tous les jours et de la nourriture constante. Elles sont dans un milieu standard avec un tunnel et du matériel de nidification. Nos souris ont un historique de vie semblable, puisqu'elles proviennent toutes des laboratoires Charles Rivers. Leur âge est semblable, entre 60 à 90 jours. La forte myélinisation juvénile devrait avoir terminé et il devrait rester seulement la myélinisation ciblée. Leur myélinisation devrait être typique et comparable entre souris. Toutes les souris utilisées sont des femelles.

Pour la microscopie photonique, six souris de type C57BL/6J ont été utilisées (Tableau 2.1). Pour la microscopie électronique, six souris ont été utilisées (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Type d'injections chez la souris C57BL/6J

| Microscopie | Nombre de souris | Épaisseur (μm) | Profondeur (μm) | Coordonnées AP (cm) | Coordonnées ML (cm) |
|-------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Photonique | 6 | 80-40 | 850 et 700 | -0,35 | -0,225 |
| EM | 6 | 100-60 | 700 et 400 | -0,35 | -0,225 |

Traçage neuronal

Puisque le traçage neuronal est au cœur de cette étude, il est important de bien comprendre la méthode d'injection utilisée, le transport axonal ainsi que les caractéristiques du traceur utilisé : *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine.

Iontophorèse

L'injection par iontophorèse utilise un courant électrique pour faire déplacer les molécules chargées. Un courant positif est envoyé dans la solution contenant des électrolytes (dans ce cas-ci le traceur) (Drouin, 1984; Purves, 1980). Puisque les molécules du traceur possèdent une charge positive, l'envoi d'un courant positif va les pousser à l'extérieur de la pipette (Oztas, 2003). La technique d'iontophorèse permet de faire des injections précises, avec les bons diamètres de pipette, intracellulaires ou extracellulaires (Oztas, 2003). Pour faire des injections en iontophorèse, il faut un générateur de courant constant. La clef d'une bonne injection en iontophorèse est la stabilité du courant (Sawchenko, Cunningham Jr, Mortrud, Pfeiffer, & Gerfen, 1990). Un courant trop fort, avec un ampérage trop élevé, pourrait laisser des lésions dans le site d'injection.

Cette technique n'est pas parfaite. La diffusion est toujours présente, même sans l'envoi de courant électrique. Les protéines du traceur vont diffuser hors de la pipette, ce qui peut résulter en un marquage dans des couches non désirées (Purves, 1980). Pour y remédier, un courant de retenue est utilisé quand la pipette est entrée et sortie du cerveau (Purves, 1980). Le courant de retenue est un courant négatif qui va être appliqué pour retenir les protéines dans la pipette. Ce courant va empêcher la diffusion des protéines du traceur et donc de marquer des couches ou cortex non désirés (Purves, 1980).

Transport axonal

Le neurone doit soutenir le métabolisme de toutes ses parties : les dendrites, le soma et l'axone (Bear et al., 2016) ainsi que le remplacement des protéines. Cependant, seul le soma possède des ribosomes où les protéines sont synthétisées (Bear et al., 2016). Le neurone a besoin de pouvoir transporter les protéines synthétisées par les ribosomes dans toutes ses parties, dont les terminaisons nerveuses des axones (Bear et al., 2016). De plus, les terminaisons nerveuses peuvent être assez éloignées du soma (Zalc, 2016). Le neurone a donc besoin d'une méthode de transport des nutriments rapide et efficace. De plus, les déchets faits par les terminaisons nerveuses doivent être ramenés au soma pour être détruits (Oztas, 2003). Ce mouvement de protéines s'appelle le transport axonal. Le transport axonal peut être soit antérograde ou rétrograde, selon la direction du mouvement des protéines (Oztas, 2003). Le transport antérograde se fait du soma aux terminaisons nerveuses, alors que le transport rétrograde se fait des terminaisons nerveuses au soma (Bear et al., 2016; Oztas, 2003). Dans les deux cas, le transport axonal utilise les microtubules, les neurofilaments et les microfilaments des axones, mais avec différentes protéines (Oztas, 2003).

Le transport antérograde utilise la kinésine. Les protéines de kinésine vont lier des vésicules de transport contenant soit des protéines, des enzymes ou des mitochondries (Oztas, 2003). Ensuite, les vésicules vont être transportées par la kinésine le long des microtubules jusqu'aux terminaisons nerveuses (Oztas, 2003). Le transport antérograde possède deux vitesses. Le transport rapide peut s'effectuer à une vitesse de 200 à 400 mm/j alors que le transport lent peut avoir une vitesse de 0,1 à 6 mm/j (Oztas, 2003). Les traceurs antérogades utilisent la méthode de transport lente. Leurs protéines vont se lier à la kinésine pour suivre le transport axonal du soma aux terminaisons nerveuses. La vitesse de transport du traceur dépend

de son affinité avec la kinésine (Oztas, 2003). Une protéine ayant une faible affinité avec la kinésine va avoir une vitesse de transport plus lent (Oztas, 2003).

Le transport rétrograde permet d'amener au soma des acides aminés, des neurofilaments, des sous-unités des microtubules, des enzymes solubles, des protéines destinées à la dégradation et les matériaux que l'axone prend par endocytose au niveau des terminaisons (Oztas, 2003). Ce mouvement est fait par l'action des protéines de dynéine (Oztas, 2003). Comme pour le transport antérograde, les protéines vont être entreposées dans des vésicules de transport qui vont se lier à la dynéine et transportées le long des microtubules jusqu'au soma. Le transport rétrograde peut se faire jusqu'à une vitesse de 100 à 200 mm/j (Oztas, 2003). Pour le traçage rétrograde de connexions neuronales, les molécules du traceur vont subir l'endocytose par les terminaisons nerveuses (Oztas, 2003). L'endocytose permet à l'axone de prendre les molécules dans le milieu extérieur et les enrober dans un lysosome pour les transporter rapidement au soma par les dynéines (Oztas, 2003).

Phaseolus vulgaris Leucoagglutinine

Le traceur utilisé est une lectine, la leucoagglutinine, de la fève rouge, *Phaseolus vulgaris* (Phal). Le Phal est un traceur utilisé depuis les années 1984 (Gerfen & Sawchenko, 1984). Les caractéristiques de marquage (spécificité du transport, remplissage de l'axoplasme, vitesse de transport) font du Phal un bon traceur axonal.

Il est strictement antérograde, c'est-à-dire qu'il suit le transport axonal seulement du corps cellulaire aux terminaisons nerveuses (Sawchenko et al., 1990). Très peu de transport rétrograde a été vu avec la protéine de Phal (Sawchenko et al., 1990). Les protéines de Phal vont entrer dans le cytoplasme, se lier à un disaccharide de galactose-mannose pour être transportées

jusqu'aux terminaisons nerveuses (Cummings, Trowbridge, & Kornfeld, 1982; Hammarstrom, Hammarstrom, Sundblad, Arnarp, & Lonngren, 1982). Puisque le Phal ne saute pas de synapse, seulement les axones provenant de la région visée vont être visibles. (Gerfen & Sawchenko, 1984; Sawchenko et al., 1990). Lors de son observation sur une coupe histologique, au site d'injection, les somas, avec leurs dendrites, vont être visibles. En quittant le site d'injection, seuls les axones provenant du site d'injection sont marqués et aucun soma des cortex de destinations ne va être visible. Le site d'injection est assez petit, lorsqu'il est injecté par iontophorèse, permettant ainsi de marquer avec précision une région très localisée dans le cortex (Sawchenko et al., 1990; Wouterlood & Groenewegen, 1985).

Contrairement à d'autres traceurs antérogrades, le Phal est une protéine qui reste dans le cytoplasme de l'axone (Lanciego & Wouterlood, 2020; Sawchenko et al., 1990). Il ne serait pas pris par les lysosomes (Lanciego & Wouterlood, 2020). Cette caractéristique lui permet de bien remplir l'axoplasme. Lors de sa révélation, les axones sont bien visibles et bien remplis. Cette caractéristique permet de savoir le diamètre de l'axone marqué ainsi que rendre bien visibles les terminaisons nerveuses (Cucchiaro & Uhlrich, 1990; Gerfen & Sawchenko, 1984; Wouterlood & Jorritsma-Byham, 1993).

Puisque le Phal subit le transport antérograde lent, sa vitesse de transport est d'environ 4-6 mm/j (Sawchenko et al., 1990). Cette vitesse peut varier selon les systèmes et l'animal utilisé. Puisque le Phal reste stable dans les neurones pour au moins 4 à 6 semaines, le Phal a le temps de se rendre aux terminaisons nerveuses pour tous les chemins neuronaux des rongeurs (Sawchenko et al., 1990). Cependant, la faible vitesse de transport peut limiter l'étude de certains chemins neuronaux dans de plus gros animaux (Sawchenko et al., 1990).

Microscopie photonique

La microscopie photonique avec un microscope confocal laser permet de voir des structures fluorescentes en 3D (Pawley, 2006). Un laser, concentré par une lentille, est envoyé en un petit point sur la structure d'intérêt (Clarke, Eberhardt, & Eberhardt, 2002; Pawley, 2006). Ce laser va alors se balayer la coupe, permettant de former une image 3D de la structure étudiée.

Les structures d'intérêt doivent être marquées d'un fluorore en suivant le processus d'une réaction immunohistochimique. Étant donné que les fluorores n'émettent que dans certaines ondes lumineuses, il est possible de choisir les ondes voulues et de marquer plusieurs structures différentes en même temps (Pawley, 2006). Par exemple, dans cette étude, le Phal va être émis dans l'onde 488, la myéline dans le 555 et le NeuN dans le 647. Habituellement, seul le Phal est visible dans l'onde 488. Lors de la prise d'image, il va être possible de faire émettre un laser dans cette onde uniquement, ce qui nous permet de ne voir que le marquage au Phal. De plus, comme il y a plusieurs lasers, il est possible de prendre en simultanément ainsi que séquentiellement des images dans différentes ondes. Dans le cas de cette étude, pour ne pas avoir de mauvais résultats, les différentes ondes ont été prises séquentiellement dans la zone d'intérêt.

Cette méthode comporte des limitations physiques. La réfraction de la lumière au travers des lentilles et de la structure d'intérêt limite le visionnement de structure plus petite que $0.2 \mu\text{m}$ (Clarke et al., 2002; Pawley, 2006). De plus, à force d'être exposée à la lumière, la fluorescence blanchit et finit par disparaître de la structure marquée (Pawley, 2006).

La méthode appliquée de la microscopie photonique est décrite dans la partie Methods du Chapitre 3.

Microscopie électronique

La microscopie électronique permet de former une image en envoyant des électrons dans le tissu (Winey, Meehl, O'Toole, & Giddings, 2014). Les électrons vont alors soit passer au travers du tissu ou rebondir sur le tissu (Nogales, 2009). Les électrons qui rebondissent sur les structures vont permettre de former l'image (Nogales, 2009). Le contraste est créé par la différence d'électron rebondissant sur les structures. Par exemple, une structure dense électroniquement (membrane cellulaire) va faire rebondir plus d'électrons qu'une structure perméable aux électrons (cytoplasme), ce qui va la faire apparaître gris foncé dans l'image (Nogales, 2009). Les structures riches en lipides (membrane cellulaire et myéline) vont, après préparation, être denses électroniquement. Pour que ces structures soient denses, du tétraoxyde d'osmium est utilisé (Winey et al., 2014). L'osmium va se lier aux lipides et certaines protéines des membranes cellulaires et de la myéline, ce qui rend ces structures assez denses électroniquement (Winey et al., 2014). Cette densité électronique va permettre la visibilité de ces structures en microscopie électronique sans l'utilisation d'un procédé immunohistochimique (Winey et al., 2014). La myéline va donc apparaître en gris foncé dans l'image de microscopie électronique. Pour que le Phal apparaisse, il doit subir une réaction immunohistochimique permettant d'ajouter des composés denses qui vont le faire apparaître très foncé en la microscopie électronique. Nous allons alors être capables de voir si les axones marqués possèdent une gaine de myéline.

Pour confirmer les résultats obtenus en microscopie photonique, de la microscopie électronique a été faite. Pour ce faire, les injections de Phal ont été utilisées. La méthode

chirurgicale n'a pas été modifiée entre la microscopie photonique et électronique. Seule la méthode pour la microscopie électronique est présentée ici.

Chirurgie

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (2 %) et maintenues à une respiration aux trois secondes pendant la chirurgie. Par la suite, le dessus de crâne a été rasé et désinfecté avec trois passages de savon, alcool et iode. De l'onguent ophtalmique de sulfates de néomycine et polymyxine B, et bacitracine, USP stérile (BNP, Vétoquinol) a été appliqué sur les yeux, empêchant la cornée de sécher. La souris a ensuite été transférée dans l'appareil stéréotaxique où les barres d'oreilles ont été installées. Une incision médiane du scalp d'environ 1 cm a ensuite été effectuée, permettant de repérer le bregma et le lambda (Figure 2.2) pour en noter les coordonnées stéréotaxiques. Les coordonnées des sites d'injection dans V1 (Tableau 2.1), ont été calculées à partir des coordonnées du bregma. Une craniotomie a été effectuée au-dessus de V1, permettant d'insérer une micropipette en verre dans le cerveau (Figure 2.1B). Le bout interne de la pipette mesurait entre 18 et 23 μm (Figure 2.1A). Les souris ont reçu 0,5 ml d'une solution saline stérile de 0,9 % (SC) avant et après la chirurgie, ainsi que 0,10 mg/kg de buprénorphine (Vetergesic) (SC) avant la chirurgie et 12,5 mg/kg de carprofène (Rimadyl, Zoetis) (SC) une fois par jour pendant les 2 jours suivant la chirurgie. Le carprofène

permet de diminuer l'inflammation causée par la chirurgie alors que la buprénorphine est un analgésique utilisé pour des douleurs modérées (Gades, Danneman, Wixson, & Tolley, 2000).

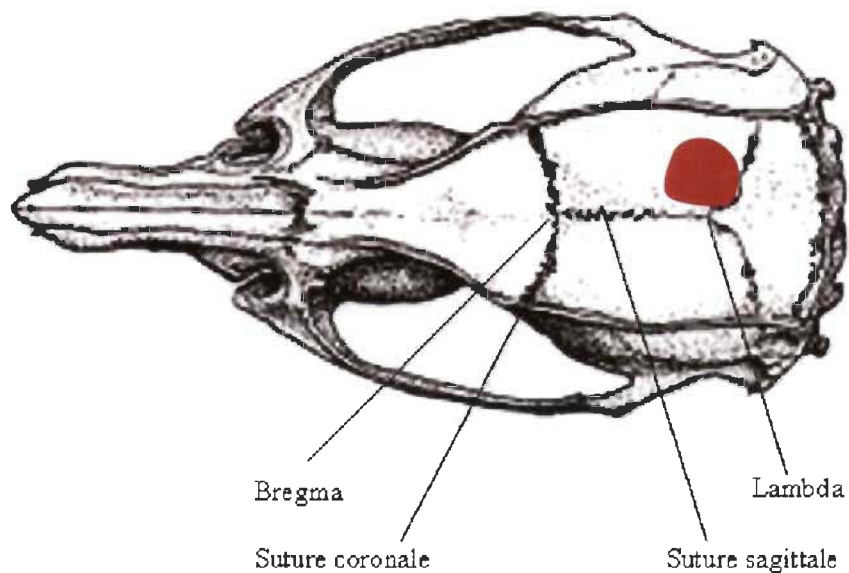


Figure 2.2. Bregma et lambda de la souris. Le cortex visuel primaire est représenté par le polygone rouge. Adapté de Bouhsira (2007).

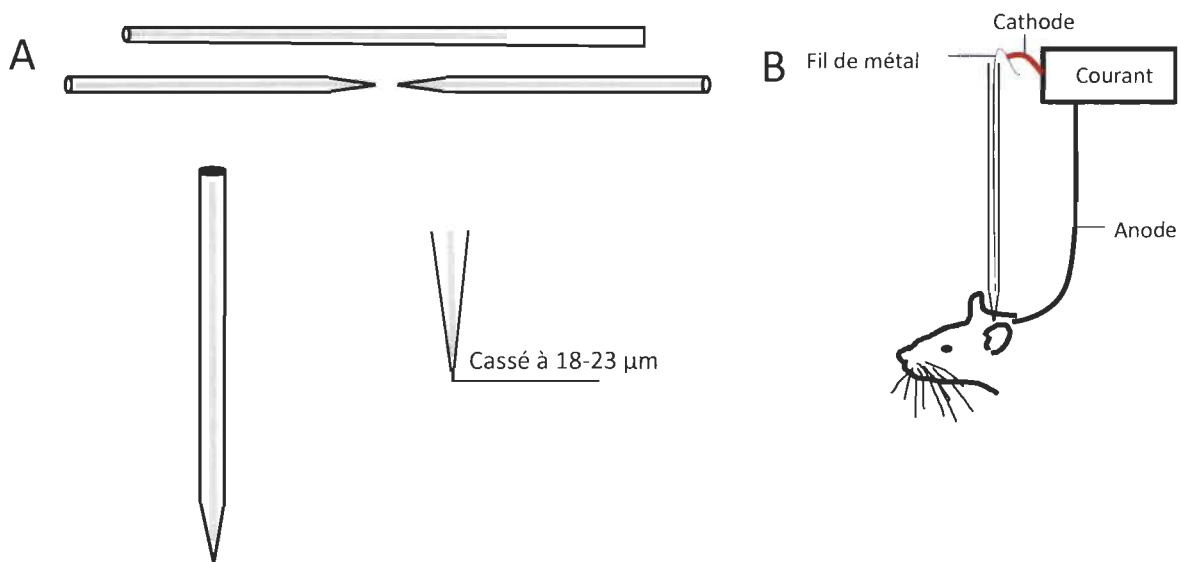


Figure 2.1 . Injection par iontophorèse. A. Le capillaire est étiré et cassé à 18-23 µm. Adapté de Odackal et al. (2017) et B. Installation de la pipette contenant la solution de Phal dans le crâne de la souris anesthésiée. Adapté de Lai, Legault, Thomas, et Casanova (2015).

Les injections ont été faites par iontophorèse (source de courant Midgard) avec le traceur antérograde *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine. L'ampérage utilisé était de 2 μ A avec un cycle de service (on/off) de 7 s. La durée des injections était de 15 minutes.

Perfusion

Les protocoles pour la perfusion et l'immunohistochimie ont été basés, avec des modifications, sur le protocole du laboratoire d'immunofluorescence du Dr. Denis Paré (Université Rutgers-Newark, NJ, É-U) décrit dans Amir, Paré, Smith, et Paré (2019).

Les souris ont été perfusées transcardiaquement avec une solution Ringer lactate pendant 20 minutes et fixées avec une solution de 4 % de paraformaldéhyde (PAF) et 0,1 % glutaraldéhyde dans du tampon phosphate (PB) 0,1 M pendant 30 minutes. Les cerveaux ont été post-fixés dans le fixateur pendant 24 h à 4 °C. Les solutions étaient froides lors de la perfusion. Ils ont ensuite été conservés brièvement dans du tampon phosphate salin (PBS) 0.1M à 4 °C jusqu'au traitement immunohistochimique.

Immunohistochimie

Les cerveaux ont été rincés deux fois dans du PBS 0,1 M et enrobés dans une solution d'Agar ($C_{12}H_{18}O_9$) 3 % et coupés à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S) à 60 μ m d'épaisseur. Les coupes ont été incubées dans une solution de borohydrure de sodium 1 % dans du PBS 0,1 M pendant 20 minutes. Le borohydrure de sodium vient bloquer les réactifs d'aldéhydes dans le cerveau issu de l'oxydation périodique des polysaccharides dans les sections contenant du glutaraldéhyde (Craig, 1974). Elles ont ensuite été rincées 4x 5 minutes dans du PBS 0.1 M ou jusqu'à ce qu'il n'y plus de réaction du borohydrure de sodium (bulles).

Les coupes ont été mises dans une solution de cryoprotection (20 % PB 0,2 M, 8 % de glycérol, 20 % de sucrose, et 52 % d'eau distillée) pendant 20 minutes. Elles ont ensuite été congelées dans des filets à -80 °C pendant 20 minutes. Elles ont été mises 10 minutes dans des solutions descendantes de cryoprotection (100 %, 70 %, 50 %, 30 %) pour finir par être rincées dans du PBS 0.1 M 4x 10 minutes à température pièce. Aucun triton n'a été utilisé dans les solutions de blocage.

Les coupes ont été mises dans la solution de blocage (1 % de sérum d'âne normal [NDS], 0,75 % de glycine dans du PBS 0.1M) pendant 12 h et incubées 72 h dans une solution de blocage contenant l'anticorps primaire anti-Phal (pour les informations, voir Tableau 3.1). Elles ont ensuite été rincées 3x 5 minutes dans du PBS 0,1 M et mis 2 h dans une solution de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-chèvre biotinilé, dilué à 1 : 500 (Jackson ImmunoResearch laboratories, 705-065-003). Les coupes ont ensuite été rincées 3x 5 minutes dans du PBS 0.1 M et incubées dans une solution d'avidine-biotine-peroxydase (kit ABC-Elite Vectastain 6100 [Vector laboratories]) pendant 1,5 h à la température ambiante. Les coupes ont été rincées 3x 5 minutes avec du PBS 0,1 M et 3x 5 minutes avec du tampon tris 0.05 M. Les coupes ont été incubées dans de la DAB-nickel (0,02 % de 3-3-diaminobenzidin tetrahydrochloride [DAB], 0,04 % nickel ammonium sulfate dans du tampon tris 0.05 M pH 7.6). Ils ont été révélés avec la même solution de DAB-nickel contenant 0,01 % de peroxyde d'hydrogène. Les coupes ont ensuite été rincées 3x 5 minutes avec du tampon tris 0,05 M et 3x 5 minutes avec du PB 0.1 M.

Les coupes ont été observées sous le microscope à disque et les régions d'intérêts sélectionnées. Les coupes choisies ont alors été osmifiées avec une solution de tétroxyde d'osmium (O_5O_4) 1 % dans du PB 0,1 M (pH 7.4) pendant 20 minutes à température pièce sur

des verres de montre. Les coupes ont ensuite été rincées 1x 2 minutes, 1x 5 minutes dans du PB 0.1 M. Les coupes ont été remises dans les puits et rincées 2x 5 minutes avec du PB 0.1 M.

Traitement pour microscopie électronique

Les tranches de cerveau ont été déshydratées dans des solutions croissantes d'éthanol, soit 30 minutes pour chaque bain, en commençant par 50 %, 70 %, 95 % et 2x 100 %. Les coupes ont ensuite été graduellement enrobées dans la résine Dr. Spurr (Electron Microscopy Science [EMS]). Chaque bain de résine durait 24 h, en commençant par un bain de 2 : 1 (éthanol : résine), 1 : 1, 1 : 3 et finissant par 100 % de résine. Tout le temps des bains de résine, les coupes étaient sur un mélangeur orbital à température ambiante. La polymérisation des coupes a été faite sur des feuilles d'ACLAR, à 80 °C pendant 12 h. Le protocole suivi pour la polymérisation était semblable à celui de Tremblay, Riad, et Majewska (2010). Les régions d'intérêts ont ensuite été coupées sous une loupe et collées avec de la colle de cyanoacrylate (Crazy glue) sur les blocs de résine.

Par la suite, la chercheuse associée du service de microscopie électronique de l'UQTR, Agnès Lejeune, a coupé les blocs à une épaisseur d'environ 60 (couleur argentée) et 100 nm (couleur dorée) à l'aide d'un ultra microtome Reichert-Jung modèle Ultracut. Les coupes ont été récoltées sur des grilles de cuivre de 150 mailles (EMS, CF150-Cu). Les coupes ont été mises 1 minute à 90 °C, permettant ainsi à la résine de coller à la grille. Afin d'améliorer le contraste, les coupes ont été traitées avec du UranylLess (EMS) et du citrate de plomb 3 % (EMS). Les grilles ont été mises sur des gouttes d'UranylLess pendant 5 minutes et rincées 3x. Ensuite, les coupes ont été séchées avec du papier filtre. Elles ont ensuite été placées sur des gouttes de citrate de plomb 3 % pendant 5 minutes, rincées 3x dans 3 béchers d'eau différents

et séchées avec du papier filtre. Une fois sèches, les coupes ont été observées sur un microscope électronique à transmission PHILIPS (EM208S).

**Chapitre 3 Myelination of the corticocortical projection in
gray and white matter from the primary visual cortex.**

Title. Myelination of the corticocortical projection in gray and white matter from the primary visual cortex.

Running title. Myelination of the corticocortical projection of V1.

Authors. Roy J., Oliveira Ferrera de Souza B. and Boire D.

Affiliations. Université du Québec à Trois-Rivières.

Acknowledgment. We would like to thank Ève-Marie Frigon and Guillaume Laliberté for their help in some surgery and perfusion. We would like to thank Agnès Lejeune for the electronic microscopy.

Funding statement. This project was possible with the funding of the CRSNG of DB and of the FRQNT.

Abstract

Myelin ensheathment increases transmission speed and could also improve synchronicity of signals despite differences in length of axonal paths to reach a specific target. Myelin distribution along the length of single axons of the cerebral cortex is poorly known. Although both myelinated and unmyelinated axons are present in both gray and white matter, the identity of the myelinated fibers at the single axon level is widely ignored. Moreover, myelin sheath can vary in length and thickness along a same axon. Typically, it is believed that in the CNS, axons connecting distant brain areas are wrapped in myelin. In addition, there are observations of myelinated local and recurrent axon collaterals of cortical pyramidal neurons. A recent study has reported that most myelinated fibers of the rodent cortex are axons of parvalbumin positive GABAergic interneurons. The objective of this study is to see the myelination pattern of visual cortex corticocortical projection axons in the mouse. Iontophoretic injections of the anterograde tracer, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (Phal), were performed in the visual cortex of C57BL/6J mice. After one-week survival, brains were harvested and cut. Myelin (myelin binding protein MBP) and Phal were revealed by immunohistochemistry. Confocal microscopic analyses of colocalization (proximity) of the axonal and MBP labeling showed that most of the visual cortex efferent axons are not myelinated. Most projections to ipsilateral cortices travelled through the gray matter whereas those to contralateral cortices travelled through the white matter. No myelinated gray matter axons were observed. Moreover, it was also noted that the orientation and morphology of the Phal labeled axons didn't correspond to the myelin labeling patterns. Myelin labeling in the mouse cortex appears as a regular columnar radial pattern of axonal bundles crossed by tangential horizontal fibers, while the Phal labeled axons had oblique orientations and travelled up and down between the myelinated fibers. The lack of colocalization in addition to morphology, suggest that most ipsilateral corticocortical projections in the mouse are through unmyelinated fibers.

Keywords. Visual cortex, Myelin Sheath, Mice, axons, gray matter, white matter.

Introduction

Myelin can increase propagation speed of action potentials by allowing saltatory axonal conduction (Hartline & Colman, 2007; Moore et al., 1978; Seidl, 2014; Smith & Koles, 1970; Waxman & Bennett, 1972) and can consequently reduce the metabolic costs of producing and maintaining voltage gated ion channels (Harris & Attwell, 2012; Nave, 2010). It can also be instrumental in the synchronization of cortical activity (Pajevic et al., 2014), and plasticity (Barrera et al., 2013; Gibson et al., 2014; Grados-Munro & Fournier, 2003; Hill, Li, & Grutzendler, 2018; McKenzie et al., 2014; Purger et al., 2016). Because of its implication in these varied and important functions, pathological loss of myelin has been well studied (Bove & Green, 2017; Garcia-Miralles et al., 2019; Lucchinetti et al., 2000; Najm et al., 2015; Nguyen et al., 2019; Stedehouder & Kushner, 2017), but the myelination of axons of different cell types and along individual axonal arbors of the cerebral cortex and of the gray matter in particular is poorly understood (Micheva et al., 2016),

The cerebral cortex comprises white and gray matter. The white matter tracts underlying the cortical gray matter mantle is composed of a dense arrangement of axons most of which are myelinated. The gray matter of the cortex also contains myelinated axons (Timmler & Simons, 2019). In the cerebral cortex, differences in the laminar density and orientation of myelinated axons have defined myeloarchitectonic features that, along with cytoarchitectonic traits have led to the segmentation of the cortical mantle in distinct fields (Nieuwenhuys, 2013; Nieuwenhuys et al., 2015; Palomero-Gallagher & Zilles, 2019; Turner, 2019). However, the nature of gray matter myelinated fibers remains largely unknown. The orientation of myelinated cortical axons has suggested that the majority of myelinated radial fibers are afferent projections

terminating in supragranular layers 3 and 4 and efferent fibers originating from layer 3 and 5, and that the tangential myelinated fibers, which are concentrated in the bands of Baillarger (the bands of Baillarger are two bands of dense myelinated fiber oriented tangentially), are efferent axons collaterals that travel for some distances within the cortical gray matter (Braitenberg, 1962). Although myelinated GABAergic local interneuron axons have been observed for some time, the quantitative importance of myelinated GABAergic neurons been assessed only recently. It was shown that a large fraction of myelinated axons in the upper layers of the cortex are those of GABAergic cortical neurons whereas the proportion of myelinated axons of non-GABAergic neurons increased with cortical depth (Micheva et al., 2016). These deep layer myelinated axons are presumed to be those of excitatory projection neurons (Micheva et al., 2016).

The extent to which axons of interareal corticocortical connections are myelinated is presently unknown. It is generally assumed that long distance connections would benefit from myelination of their axons and the faster conduction speeds it enables. Myelinated U fibers (U-fibers are short association fibers connecting adjacent gyri) could be interareal myelinated fibers although a direct demonstration of this is still lacking. In primates, it has been shown that connections between distant cortical areas are established by axons that travel in the white matter whereas close areas are connected through axons that remain within the cortical gray matter (Levitt, Lewis, Yoshioka, & Lund, 1993; Lund, Yoshioka, & Levitt, 1993). In the mouse, a recent study has shown that the axons of ipsilateral cortico-cortical projections travel mostly in layer 6 of the cortical gray matter while callosal and subcortical projections travel in the underlying white matter (Watakabe & Hirokawa, 2018). Whether corticocortical projection axons in gray matter are myelinated is presently unknown.

The objective of this study is to see whether the ipsilateral and contralateral corticocortical efferent projections of the primary visual cortex are myelinated. In general, primary sensory cortices contain more myelin than higher association frontal cortices (Glasser, Goyal, Preuss, Raichle, & Van Essen, 2014; Glasser & Van Essen, 2011; Sanides, 1969). The cortical projections of the mouse primary visual cortex are well known. It maintains a dense network of ipsilateral cortical projections to at least nine extrastriate visual areas (Froudarakis et al., 2019; Wang & Burkhalter, 2007; Wang, Gao, & Burkhalter, 2011; Wang et al., 2012) as well as contralateral cortical projections through the corpus callosum (Olavarria & Montero, 1989)

Anterograde tracer injections were performed in the primary visual cortex of the mouse and combined with myelin basic protein immunohistochemistry to determine whether axons of visual cortico-cortical projections are myelinated.

Methods

All procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and protocols were approved by the Comité de Bons Soins aux Animaux of the Université du Québec à Trois-Rivières. Seven C57BL/6J mice (Charles River, Montréal, QC, Canada) between 60-90 days of age when sacrificed were used. All animals were kept under a 14/10h light/dark cycle with food and water *ad libitum*.

Surgery

Anesthesia was maintained with an inhalation of 2% isoflurane and vital signs were closely monitored throughout surgical procedures. The eyes were protected with an ophthalmic ointment (Vetoquinol). The mice were placed in a stereotaxic apparatus, a scalp incision was made along the midline to expose the skull and a craniotomy was made at 3.5 mm caudal and 2.25 mm lateral to the bregma for injections in the primary visual cortex. Two iontophoretic injections of a 2% solution of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (Phal) were performed at 700 and 850 μm from the pial surface for each site through glass micropipettes with tip diameters between 18-22 μm , using 2 μA positive current pulses with a 7 sec on/off duty cycle for 15 minutes each.

After a one-week survival period, the mice were deeply anesthetised with an inhalation of 5% isoflurane and perfused with a solution of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M PBS. Brains were harvested and post-fixed in a 4% PFA in 0.1M PBS solution for one hour at ambient temperature and placed overnight in a 30% sucrose in 0.1 M PBS solution for cryoprotection. They subsequently were frozen and kept at -80 °C until further histological processing.

Immunohistochemistry

The brains were cut in 40 or 80 μm coronal sections with a freezing microtome. Sections were rinsed in PBS 0.1 M (3X 5 min), incubated for 30 min in 50 % methanol and again rinsed 3 times in PBS 0.1M. Sections were subsequently put in a blocking solution (0.1 M PBS containing 0.75 % glycine, 2 % of triton-100x, 1% normal donkey serum (Jackson

immunoresearch laboratories, 017-000-121)). Sections were then incubated in a the blocking solution containing the Phal, MBP and NeuN primary antibodies (Table 1) for 72h. Sections were rinsed 3 times in 0.1M PBS and incubated for 2h in the blocking solution containing the secondary antibodies (see Table 1) followed by three 5 min rinses in 0.1 M PBS. Sections were subsequently mounted on slides, dehydrated through graded ethanol, cleared in xylenes and coverslipped with EUKITT.

Antibody characterisation

The myelin basic protein (MBP) antibody (Abcam, ab40390, used at 1:1000) is a synthetic peptide corresponding to mouse myelin basic protein aa150 to the C-terminus conjugated to keyhole limpet haemocyanin. It was raised against an immunogen that is predicted to recognize isoforms of myelin basic protein. The predicted molecular weight of isoforms are 18.5 kDa, 17 kDa, 14 kDa, 21 kDa and 13 kDa on western blot of mouse brain. It stained myelin membrane profusely in central and peripheral nervous system (Abcam, 2020).

The *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (Phal) antibody (Vector laboratories, used at 1:1000) targets the lectin of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. It stained only the Phal lectin in previous report (Lima et al., 2019)

The neuronal nuclei (NeuN) antibody (Millipore Sigma, ABN90, used at 1:6000) is a polyclonal peptide that recognises the DNA-binding, neuron-specific protein NeuN present in most central nervous system and peripheral nervous system neuronal cell. It shows a single band at 48 kDa on western blot of mouse brain E16 tissue lysate. Staining test were to determine the correct dilution.

Table 3.1. Antibodies informations

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

Imaging and Analysis

Phaseolus injection sites were effectively in the visual cortex of the mice. In all the sections which the injections sites appeared, Phal labeled axons travelling in the gray matter through the visual cortex toward the medial and lateral borders of V1 were located with low power objectives (10x PL APO NA 0.40; 20x PL APO NA 0,75) and were subsequently examined at higher power (63x PL APO NA 1,40 oil) to detect co-labeling with MBP. High power image stacks were acquired with a Leica TCS SP8 confocal laser microscope. Image stacks comprised two acquisition channels to capture fluorescence of Alexa 455 and 555. Images stacks consisted of 0.2 microns spaced frames with no electronic zoom and pinhole was set to 1 Airy. Each frame of 1024 X 1024 pixels have voxels dimensions of 0.18 X 0.18 X 0.30 microns.

Colocalization of Phal and MBP was considered when the signals of the two fluorochromes coincided and when axonal segments were independently visualized in both Alexa 488 (Phal+) and Alexa 555 (MBP+) channels. NeuN was visualized with the Alexa 647 and used only to determine the layers of the cortices.

Results

Six mice were injected into the primary visual cortex (Figure 3.1 a). Diameter of injection sites was between 400 and 700 μm (Figure 3.1 a). The injections did not overflow into adjacent extrastriate areas. The bright core of injections spanned through all cortical layers. Phaseolus injections in the visual cortex typically produced labeled axons in known targets such as the adjacent extrastriate higher order visual cortical areas (HVA) and in the dorsal lateral geniculate nucleus (DLG), and in the superficial layers of the superior colliculus (SC), (Fig. 3.1 a, b, c) (Froudarakis et al., 2019; Oh et al., 2014). The terminal fields in HVA were typically columnar as shown in lateral V2, likely area LM (Figure 3.1 a).

In all cases, tangentially oriented Phal labeled axons could be seen emanating from the injection sites traveling in layer 6 of the cortical gray matter and directed towards medial and lateral extrastriate cortical visual areas (Figure 3.1 a). As labeled axons arrived in the HVA terminal fields, they made a sharp turn towards the pial surface and emerging side branches adopted more oblique and radial orientations. In layer 1, they take a more tangential orientation inside the terminal field. In the extrastriate target areas, labeled axons formed a columnar terminal field distributed throughout the cortical depths (Figure 3.1 a), typical of a feedforward projection from V1 in extrastriate areas (Coogan & Burkhalter, 1993).

In addition to gray matter axons, dense bundles of Phal-labeled axons penetrated the white matter immediately under the densely labeled injection site (Figure 3.1 a). Upon entering the external capsule (EC), the axons made a sharp turn and were directed either medially or laterally. EC axons could be followed medially towards the splenium of the corpus callosum (Figure 3.1 d).

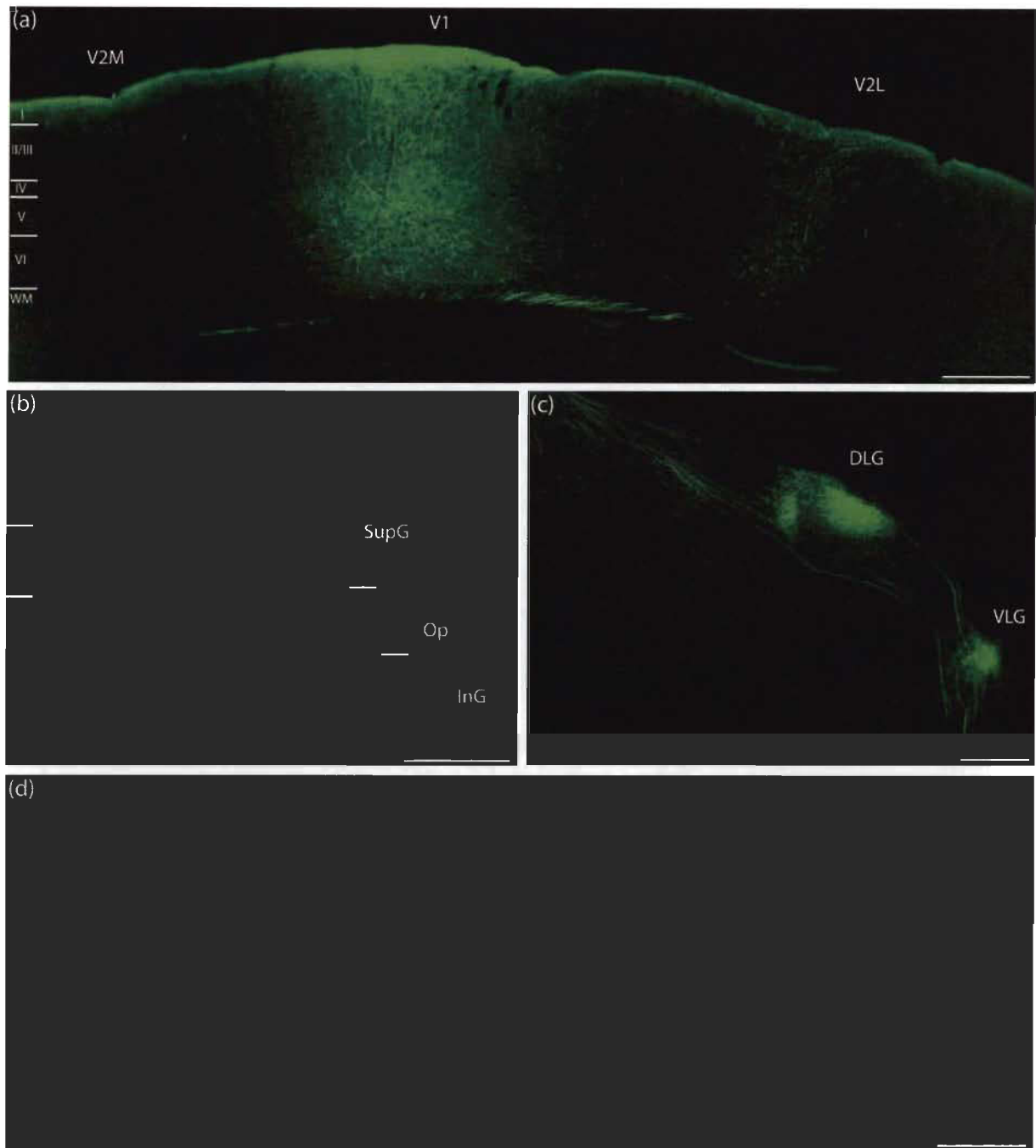


Figure 3.1. Photomicrograph of Phal staining. A. Injection site and HVA staining. B. Superior colliculus. C. dorsal lateral geniculate D. Corpus callosum. Scalebars: A-C, 250 μ m and C. 100 μ m.

MBP immunohistochemistry produced a labeling pattern typical of cortical myeloarchitecture in mouse (Figure 3.2 a) (Redlich & Lim, 2019; Zilles et al., 2016). In general, in the mouse neocortex, myelin density is extremely high in the white matter and the density of labeled axons decrease towards the pial surface. In addition to density, MBP+ fiber orientations

vary between cortical layers. In the superficial layer 1, MBP+ fibers form a dense lattice of tangential fibers (Figure 3.2 a). This layer contrasts with the lower density of labeled fibers in the topmost tier of layer 2 (Figure 3.2 a). Layers 2/3 comprise mainly radially oriented fibers. These fibers reach the top of these layers in primary visual cortex and in lateral V2 and, in many instances, fibers were seen crossing from layer 2 into layer 1. (Figure 3.2 c, d). Density of radial labeled fibers was lower in medial V2, labeled fibers were mostly in the bottom tier of layer 2/3 and only occasional fiber were seen climbing towards layer 1 (Figure 3.2 b).

MBP immunolabeling was performed on 80 μ m thick section initially to maximise the probability of finding double-labeled axons. The MBP antibody penetration in these sections was, however, suboptimal, and further sections were performed at 40 μ m. Even in these sections, penetration of MBP antibody throughout the section thickness was not complete. Because sections were processed free-floating, MBP labeling was intense and clear on both surfaces of the sections and penetrated efficiently for 10-15 μ m on each side. The labeling intensity was lower in the middle 10-15 μ m of the sections. All Phal+ axons examined for colocalization with MBP were in the depths of the sections in which MBP labeling was bright and unequivocal. There was, consequently, a low yield of double labeled axons which are both MBP and Phal immunopositive.

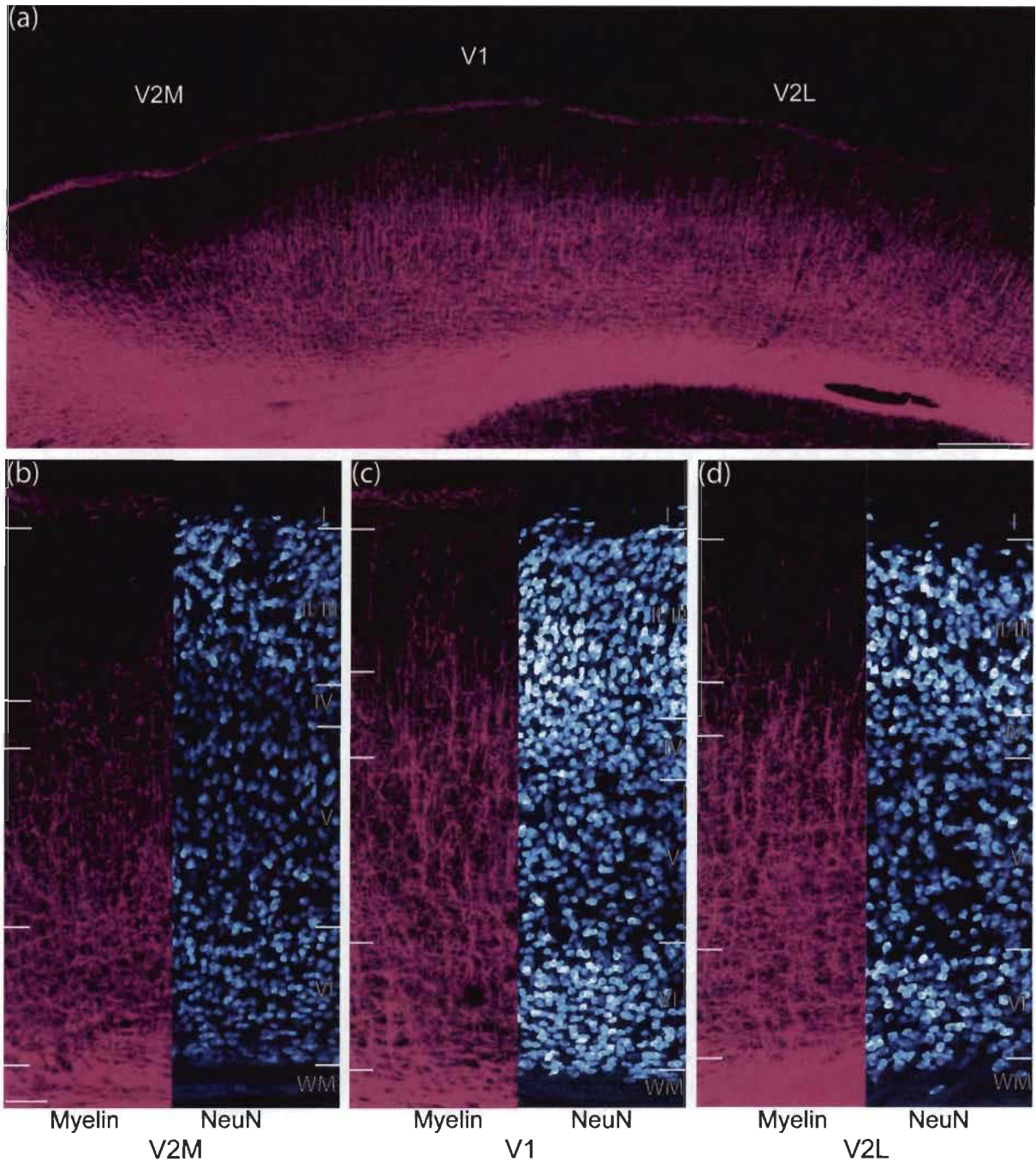


Figure 3.2. Myeloarchitecture of the mouse. A. Photomicrograph of V1, VL and V2M. C,D,E. Closeup on myeloarchitecture and cytoarchitecture of the adjacent section of V2M, V1 and V2L. Scalebar: A. 250 μ m; C-E. 50 μ m.

Most of the Phal⁺ corticocortical axons did not appear to be MBP⁺ in both the ipsi- and contralateral gray matter. Although unambiguous identification of double labeled axons in the white matter has proven challenging, some clearly unmyelinated Phal labeled axons were observed traveling within densely MBP⁺ labeled areas. One can surmise at this point that

corticocortical axons of the primary visual cortex efferent projections that travel in the gray matter are largely unmyelinated. Some unmyelinated axons were also clearly identified in the external capsule and in the corpus callosum.

Gray matter axons

Immediately around the injection site, Phal+ axons were seen in the gray matter mainly in layer 6 but also in layer 5 (Figure 3.1 a). Although individual axons were not reconstructed over any lengths of their trajectory to their terminal targets, many were seen coursing into lateral or medial HVAs (Figure 3.1 a). No doubled labeled axons were observed emanating from the injection sites in the gray matter. Phal+ axons in layers 5 and 6 were mostly tangentially oriented whereas some axons had a more oblique orientation (Figure 3.3 d,e). MBP labeling in these deep cortical layers forms a very dense lattice of distinctly radial fibers interspersed with tangential and oblique fibers (Figure 3.3 b). Even on low power photomicrographs, the single labeled Phal+ axons can be clearly seen as distinct from the MBP+ axonal segments. Short segments of Phal+ axons appeared to overlap with MBP immunostaining. These apparent sites of colocalization appear only in the maximum intensity projections of images stacks. Orthogonal view projections of the image stacks confirmed that Phal+ and MBP+ axons were distinct. Phal+ tangential axons crossing the V1 borders were also prevalent in layer 1 (Figure 3.3 c). These Phal+ axons can often be followed within a same coronal section for significant distances. Superimposition of MBP and Phal images shows that these two axons populations are clearly distinct (Figure 3.3 c,d,e). Axons crossing the borders of V1 with HVAs were not observed in layers 2/3 in which mainly radial MBP+ axons were found.

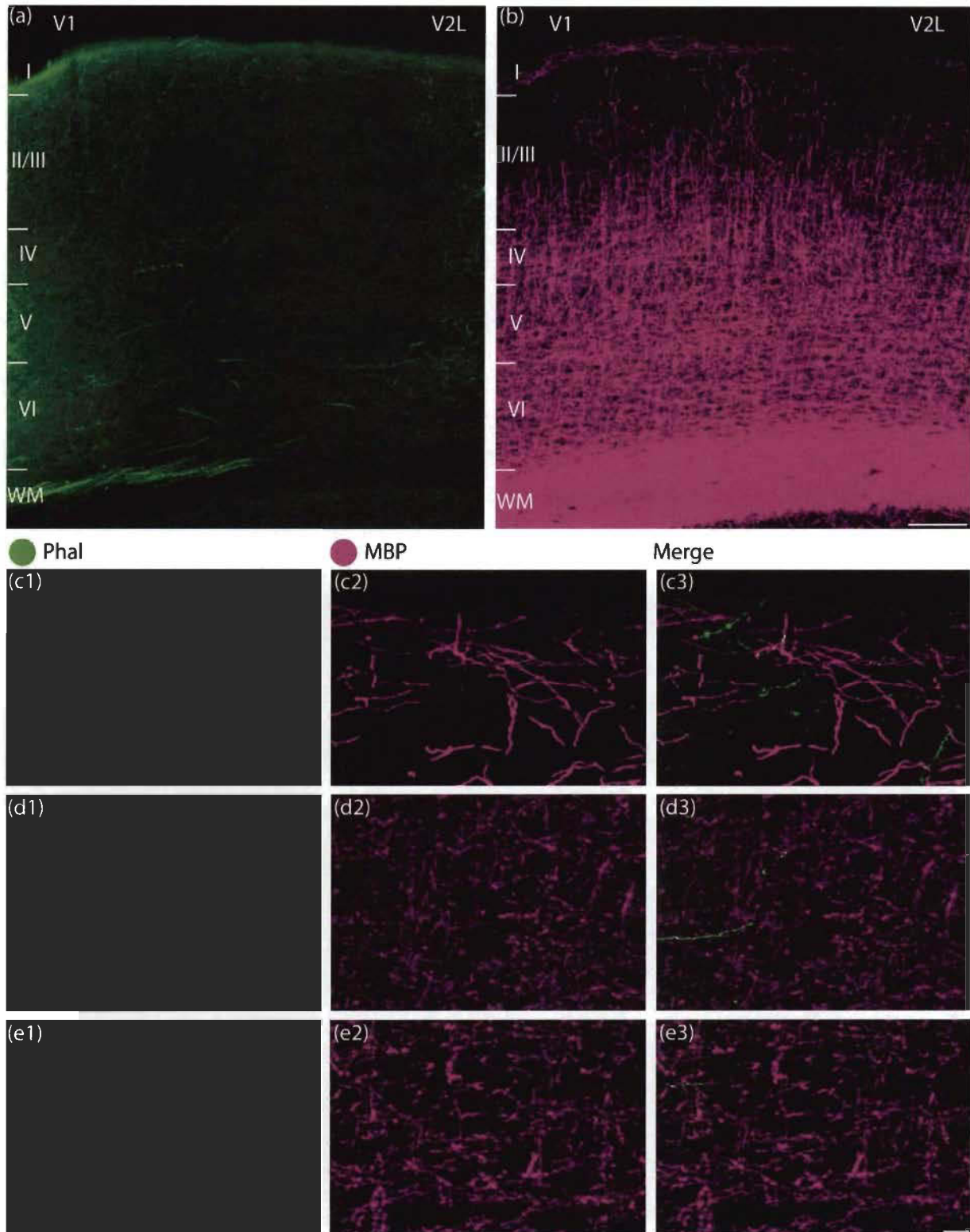


Figure 3.3. Photomicrograph of ipsilateral V1-V2L border. A. Phal staining. B. MBP staining. C,D,E. Closeup on layers 1, 5 and 6. To the left, the Phal labeling, in the center, the MBP labeling and to the right, the merge of the Phal and MBP labeling. Scalebars: A,B. 100 μ m; C,D,E. 10 μ m.

Phal labeled axons in the gray matter ipsilateral to the injections entered the HVA terminal fields and appeared to branch profusely and formed a columnar projection that spanned the full cortical depth as typical of feedforward corticocortical projections in the mouse (Figure 3.4 a) (Coogan & Burkhalter, 1990, 1993). Although the Phal+ axons in these terminal fields had a different orientation depending on the layers that largely corresponded to the orientations preferentially seen for the MBP + axons (Figure 3.4 b), only one Phal labeled axons was seen to be myelinated (Figure 3.5 a). Indeed, Phal+ axons in layer 5 and 6 had tangential and radial orientations (Figure 3.4 f, g). Phal+ axons in supragranular layers had a clear radial orientation (Figure 3.4 d, e). Upon reaching layer 1, they made a sharp turn to take a tangential orientation. (Figure 3.4 c).

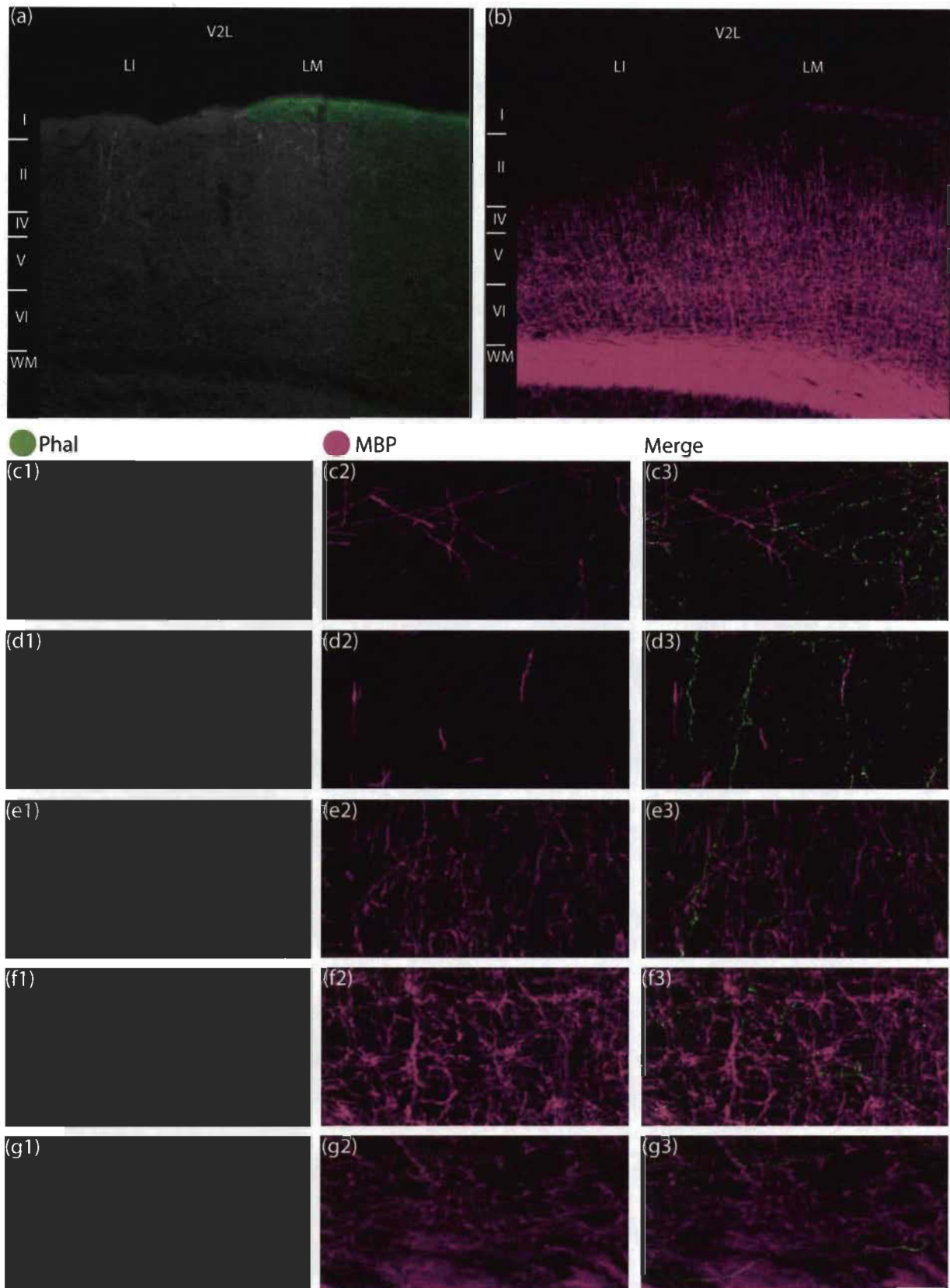


Figure 4. Photomicrograph of ipsilateral V2L terminal field. A. Phal staining. B. MBP staining. C-G. Closeup on layers 1, 2-3, 4, 5 and 6. To the left, the Phal labeling, in the center, the MBP labeling and to the right, the merge of the Phal and MBP labeling. Scalebars: A,B. 100 μ m. C-E, 20 μ m.

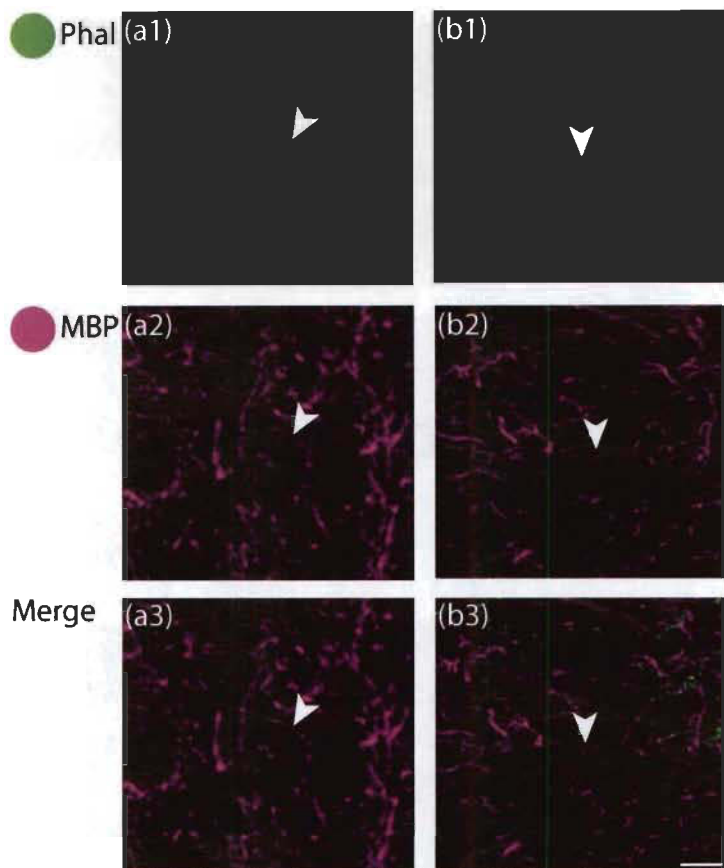


Figure 3.5. Double-labeled axons. Up, the Phal labeling, in the center, the MBP labeling and to the bottom, the merge of the Phal and MBP labeling. White arrows show the double-labeled axons. A. V2L terminal field, layer 6. B. RSD terminal field. Scalebars: 10 μ m.

Another double-labeled axon was observed in the retrosplenial granular cortex (Figure 3.5 b). This double-labeled axon can be observed until it reaches the EC. It is not clear if this axon came from the EC or was travelling in the layer 6 near the EC since no reconstruction was done. A small section seems not to have MBP+ labeling, place between two double-labeled parts. This axon is tangentially oriented and was observed near the bottom surface of

RSG. This axon seems to terminate in the RSG.

In the contralateral gray matter to the injection, Phal labeled axons entered the V1 terminal fields and appeared to branch profusely and formed a columnar projection that spanned the full cortical depth (Figure 3.6 a). MBP+ fibers possessed a tangential and radial orientation typical of V1 terminal field (Figure 3.6 b). Phal+ axons make a sharp turn from white matter to V1 terminal field. They take a mostly vertical orientation until they reach layer 1, where they take a tangential orientation (Figure 3.6 c). Phal+ axons seem to bunch on layer 5 and 4 and send tangentially oriented axons in the terminal field. Even then, no myelinated axons were seen in V1 contralateral terminal field.

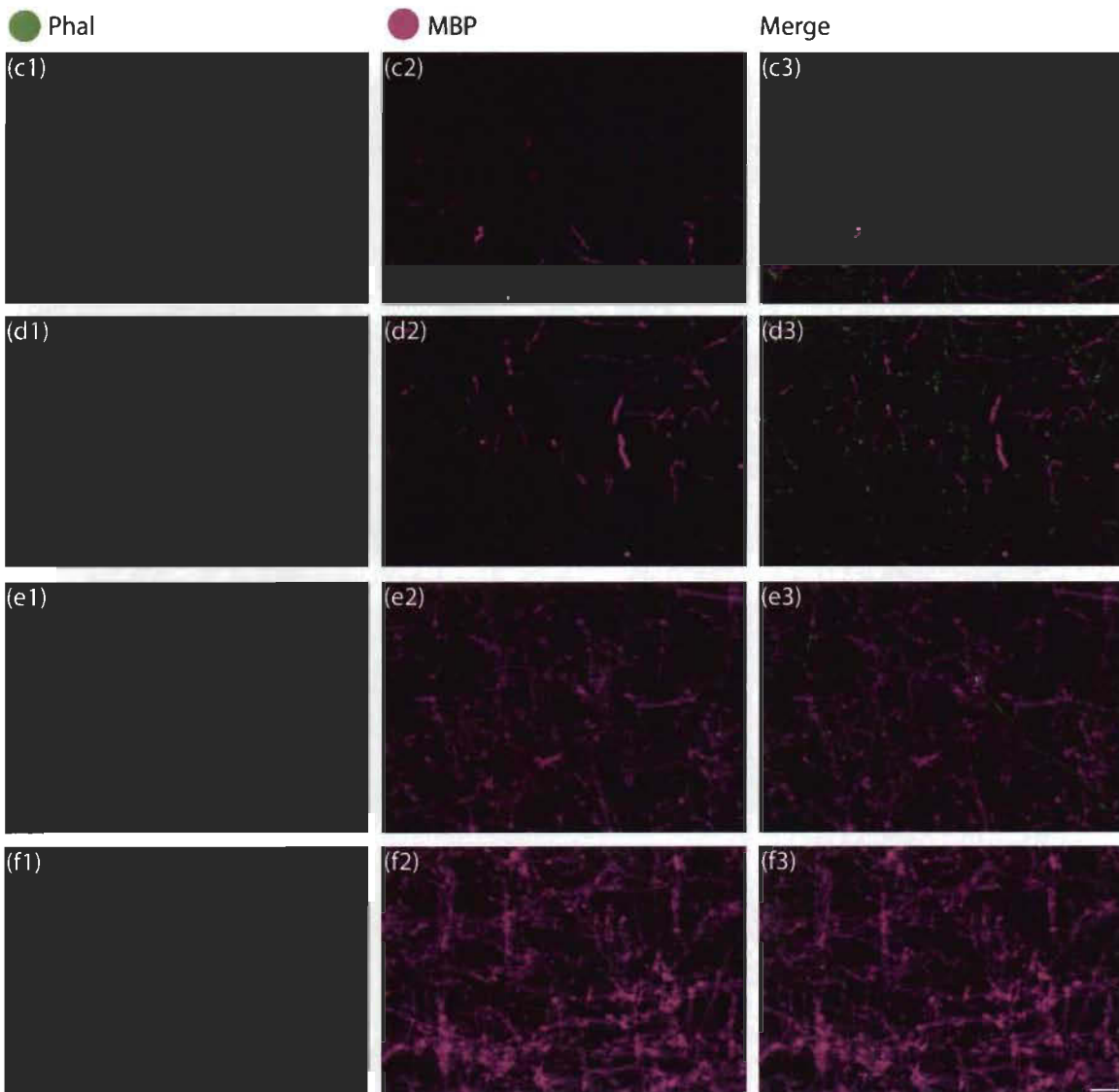


Figure 3.6. Photomicrograph of contralateral V1 terminal field. A. Phal staining. B. MBP staining. C-F. Closeup on layers 1, 2, 5 and 6. To the left, the Phal labeling, in the center, the MBP labeling and to the right, the merge of the Phal and MBP labeling. Scalebars: a,b. 100 μ m. c-f. 10 μ m.

White matter

Clearly labeled bundles of Phal+ axons were observed in the white matter underlying the injection sites (Figure 3.1 a). In the EC and corpus callosum white matter the proximity of the high density of the MBP labeling made it difficult to determine unambiguously whether Phal labeled axons were individually MBP immunopositive.

External capsule

Immediately under the injection site, densely labeled Phal+ axon bundles were observed in the external capsule (EC) (Figure 3.1 a). Phal labeled axons formed two clear compact bundles, one directed laterally (Figure 3.7 a) and one medially (Figure 3.7 b). Further along in the ipsilateral external capsule, the bundles become less compact and individual axons could be deciphered. In most instances the individual axons were embedded in compact white matter and the state of myelination of individual axons could not be resolved. However, small gaps in the dense MBP labeling permitted to visualize clearly unmyelinated axons within the cortical white matter. A similar pattern was found in the external capsule underlying the contralateral visual cortices (Figure 3.7 d). Here also, the myelination of the Phal labeled fibers located in dense MBP labeling cannot be substantiated. However here also individual clearly unmyelinated axons were observed in all cases.

Corpus callosum

Phal+ axons observed in the corpus callosum were ambiguous to determine myelination. These Phal+ axons exhibited undulating trajectories, following the general texture of the MBP labeling in the corpus callosum (Figure 3.7 c). Here also, clearly unmyelinated axons travelled in small gaps located in between the intense MBP labeling (Figure 3.7 c).

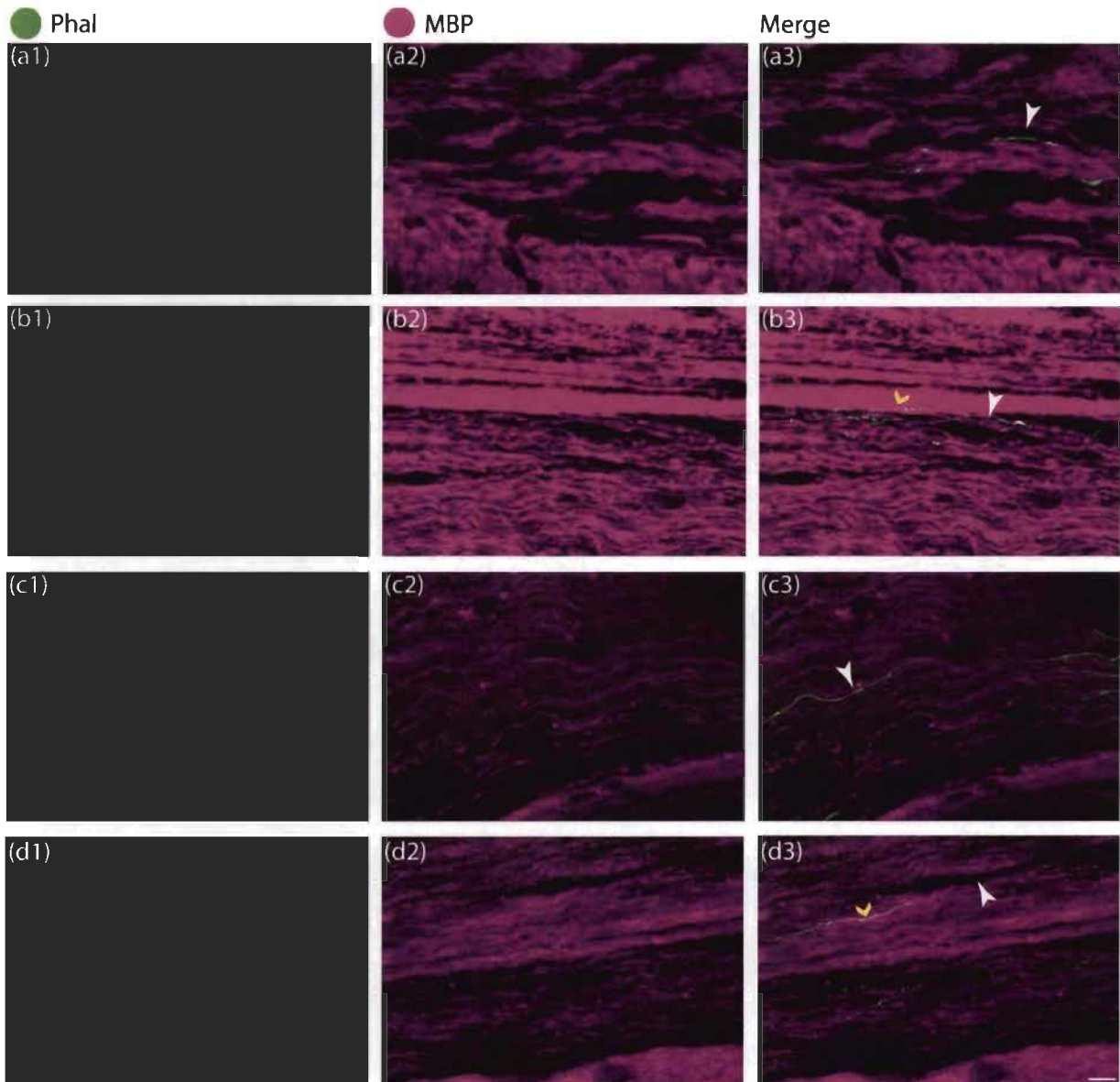


Figure 3.7. Photomicrograph of white matter. To the left, the Phal labeling, in the center, the MBP labeling and to the right, the merge of the Phal and MBP labeling. The big white arrows show the Phal+ only axons. The small yellow arrows show the double-labeled axons. A. Ipsilateral lateral EC. B. Ipsilateral medial EC. C. Corpus callosum. D. Contralateral. Scalebars: 10 μ m.

Discussion

Phal and MBP staining

Injections of the anterograde neuronal tracer, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the primary visual cortex produced labeled axons in known projection targets of this cortex, namely the dorsal lateral geniculate body and the superficial layers of the superior colliculus. (Lund, 1964; Oh et al., 2014). Axons were seen exiting the injections site entering the external capsule white matter and traveling within the cortical gray matter mainly within layer 6 and to a lesser extent layer 5. This is consistent with previous observations on single axon reconstructions that show projections from the mouse primary visual cortex to LM through these layers (Massé et al., 2016). This is also in agreement with the proposal that the axons of ipsilateral corticocortical projections travel within gray matter layer 6, whereas axons of callosal and subcortical projections engage in the external capsule white matter (Watakabe & Hirokawa, 2018). The labeling in the ipsilateral extrastriate visual cortical areas was consistent with the known V1 cortical projections therein (Coogan & Burkhalter, 1993; Wang & Burkhalter, 2007). The Phal labeling in these cortical areas was columnar and extended over all cortical layers typical of feedforward corticocortical visual projections in rodents (Coogan & Burkhalter, 1990, 1993; Wang & Burkhalter, 2007; Wang et al., 2012). In light of these observations, our search for myelinated axons of ipsilateral corticocortical visual projections was directed mainly towards layers 5 and 6 at the borders of the primary visual cortex and the surrounding HVA, whereas myelinisation of callosal axons was assessed by directing the observations of Phal labeled axons within the corpus callosum and in the contralateral external capsule and gray matter terminal fields.

MBP labeling was commensurate with previous myeloarchitectonic observations in rodents (Zilles et al., 2016). Myelin density in the visual cortex and adjacent visual areas was greater in the deeper layers 5 and 6 and decreased toward the pial surface, and orientation of myelinated fibers also varied between cortical layers. This pattern was seen in the mouse, rat, primate and human (Nieuwenhuys et al., 2015; Zilles et al., 2016). Radial myelinated fibers were mainly in the layers 2-4 and tangential fibers were predominant in the infragranular layers and also in layer 1, as previously shown in rodents (Zilles et al., 2016).

Gray matter axons

The vast majority of the observed ipsilateral corticocortical axons were unmyelinated. Indeed, only two myelinated axons were observed in the cortical gray matter. There are three reasons that can explain the exceptionally low yield of myelinated axons in our material. Firstly, the incomplete penetration of the MBP antibody throughout the thickness of the sections reduced the overall volume of tissue that could be observed. However, care was taken to consider Phal labeled axons only within the depth of the sections in which MBP penetration was adequate. Consequently, our sample, although reduced, was not biased. Secondly, the question was raised whether Phal antibodies can penetrate through the myelin sheet (Anderson & Martin, 2006; Tamas, Buhl, & Somogyi, 1997). In this ultrastructural EM study, Phal labeled terminals were observed however, they show a clearly labeled terminal with the adjacent myelinated axon shaft in which phal labeling was absent (see their figure 2 c). The question then arises whether Phal antibody might not penetrate through the myelin sheath. However, in a Phal tracing ultrastructural study of corticothalamic projections from the barrel field cortex, (Hoogland et al., 1991) it is reported that most of the Phal labeled axons in the internal capsule were

myelinated (however not shown). Preliminary EM observations of our material agree with this observation and show clearly Phal labeled myelinated axons in the external capsule underlying the visual cortex injections (not shown here). Therefore, it seems unlikely that Phal antibodies cannot penetrate through the myelin lamellae. Thirdly, ipsilateral cortical projection axons are generally not myelinated as was shown here.

The visual cortex and the adjacent HVA show similar MBP laminar labeling patterns. Specifically, there was a dominance of radial MBP+ fibers in the supragranular layers and an important contingent of tangential fibers in layer I and in infragranular layers. Since interareal cortical projections travel in the infragranular layers (Watakabe & Hirokawa, 2018), it was expected that those that actually cross the borders of the primary visual cortex might correspond to a subset of the myelinated fibers in these layers. In humans, the bands of Baillarger are discontinuous at cortical boundaries suggesting that these fibers convey local connections within a cortical area and are not involved in inter-areal connections (Turner, 2019). In the mouse there are no distinct bands of Baillarger nor abrupt changes in the myeloarchitecture of tangential fibers, and there are myelinated fibers that seem to cross area boundaries. Nonetheless, we found no evidence for interareal myelinated Phal labeled axons. In humans, myelinated U fibers in the surface layer of the white matter layers can cross between cortical areas (Schuz & Braitenberg, 2002). This indicated two fundamental differences between rodents and primates. Firstly, contrary to primate, ipsilateral corticocortical projections in mice travel in the gray matter, and secondly, in mice, there are unmyelinated ipsilateral corticocortical interareal projections axons.

MBP immunostaining of the mouse visual cortical areas shows the horizontal myelinated fibers forming the Exner stripe in layer I. The sparse MBP labeling clearly showed isolated

individual myelinated fibers making the identification of myelinated Phal+ axons much easier than in dense MBP labeling of deeper cortical layers and in the white matter. Phal injections in V1 produced here a continuous band of labeled axons in layer 1 crossing the borders into extrastriate areas. Although, the Phal+ and MBP+ axons in layer 1 were similar in size and orientation, they appear to be completely distinct populations. Corticocortical projections are known to travel for some distances in layer 1 in both feedback and feedforward projections in monkeys (Anderson & Martin, 2006; Coogan & Van Essen, 1996; Kuypers, Szwedart, Mishkin, & Rosvold, 1965; Rockland, 2019; Rockland & Virga, 1989).

Layer 1 also contains axons of thalamocortical projections. Specific tracer deposits in layer 1 retrogradely labeled neurons in several thalamic nuclei but not in specific sensory nuclei (Avendaño, Stepniewska, Rausell, & Reinoso-Suárez, 1990; Carey, Fitzpatrick, & Diamond, 1979a, 1979b; Rausell & Avendaño, 1985). Multispecific and non-specific thalamocortical projections in rodents also terminate extensively in layer 1 (Clasca, Porrero, Galazo, Rubio-Garrido, & Evangelio, 2016). Whether these axons are myelinated remains unknown. However, it has been suggested that thalamocortical axons were myelinated until they reached the cortical gray matter and myelination decreases as they exit the white matter. (Salami et al., 2003). A large proportion of the cortical grey matter myelin ensheathes axons of locally projecting parvalbumin GABAergic interneurons (Micheva et al., 2016; Stedehouder et al., 2017). Parvalbumin immunopositive neurites can be seen in layer 1 in rodents (Micheva et al., 2016). However, only a small proportion of GABA+ myelinated axons are found in this layer. GABA myelinated PV+ axons in layer 1 have radial to oblique orientations whereas the MBP+ fibers we show here are mainly tangential. The identity of the myelinated layer 1 axons remains largely unknown.

Although some cortical GABAergic neurons also engage in long-range subcortical (Caputi, Melzer, Michael, & Monyer, 2013; Melzer et al., 2017; Rock, Zurita, Wilson, & Apicella, 2016) as well as cortical connections (Higo, Udaka, & Tamamaki, 2007; McDonald & Burkhalter, 1993; Peters, Payne, & Josephson, 1990; Tomioka et al., 2005; Tomioka & Rockland, 2007), the vast majority of the long range corticocortical GABAergic neurons express somatostatin (Higo, Akashi, Sakimura, & Tamamaki, 2009; Higo et al., 2007; Tomioka et al., 2005; Tomioka & Rockland, 2007). Since only a small fraction of cortical myelin is found on SOM+ interneurons (Micheva et al., 2016; Stedehouder et al., 2019), the contribution of these neurons to myelinated corticocortical projections could be expected to be at the most, minor.

White matter axons

Myelination of callosal and white matter axons could not be determined because of the high density of MBP labeling. However unmyelinated axons were positively identified in the white matter and the corpus callosum. Other studies had found unmyelinated axons in the cortical white matter (Partadiredja et al., 2003; Turner, 2019).

We found no evidence here in mice for myelinated axons in the ipsilateral visual corticocortical projections. This raises the question of why these cortical projections might not be myelinated. The role of myelin has been greatly researched (Gibson et al., 2014; Harris & Attwell, 2012; Hartline & Colman, 2007; Pajevic et al., 2014). Myelin renders more efficient the transmission of action potentials, enhances synchrony and provided electric insulation between axons (see Turner, 2019 for review). Moreover, myelin can reduce plasticity by inhibiting neurite growth (Lozano, Schmidt, & Roach, 1995; Thallmair et al., 1998) and preventing the establishment of synaptic contacts on myelinated axons (Braitenberg, 1962).

Perhaps these visual projections in the mouse need to establish synaptic contact as they travel to their final targets and maintain some level of plasticity even in the adult stages.

Future perspective

This study demonstrate that a difference exists between ipsilateral and contralateral axons in the primary visual cortex. Other sensorial cortices, as the frontal and motor cortices, could be more or differently myelinated. Also, only feedforward axons were studied here. Myelination could differ for feedback axons. Further studies are needed to help understand the origin of myelinated axons.

Conclusion

This study suggests that ipsilateral corticocortical visual projections from the primary visual cortex that travel in the gray matter (Watakabe & Hirokawa, 2018) are not myelinated and that the projections that engage in the white matter and the corpus callosum comprise a contingent of unmyelinated axons. This contrasts with the presence of myelinated corticocortical U fibers in primates (Schuz & Braitenberg, 2002) and ferrets (Yoshino et al., 2020). Perhaps the greater constraints imposed by the added distance for the synchrony of callosal projections might require faster conduction speeds the myelinisation of callosal projections in mice. Conversely, requirements of maintained plasticity and synapse formation in combination with short distances of the ipsilateral cortical projections might prevent the myelination of these pathways in mice.

Conflict of interest

We have no conflict of interest.

Chapitre 4 Résultats supplémentaires

Quelques problèmes ont été soulevés pendant l'expérience. La première était la pénétration de l'anticorps de MBP. Le marquage de MBP n'était visible que sur la surface des coupes, surtout dans la matière blanche. Le deuxième problème soulevé était la forte densité de MBP dans la matière blanche. Cette densité ne permettait pas de bien déterminer la myélinisation des axones individuels dans la matière blanche. Le troisième problème soulevé était la possibilité que les anticorps de Phal ne pénétraient pas au travers de la gaine de myéline. Pour répondre à ces problèmes, de la microscopie électronique a été faite en plus de la microscopie photonique.

Microscopie photonique

Problème de la pénétration des anticorps

Les anticorps de MBP ne pénétraient pas jusqu'au centre de la coupe. De plus, la pénétration est encore moindre dans la matière blanche que dans la matière grise (Figure 4.1 A-D). Dans la matière grise, les couches superficielles 1 à 4, possèdent une pénétration complète de l'anticorps (Figure 4.1 C-F). La pénétration des couches 5 et 6 n'est souvent pas complète, mais meilleure que dans la matière blanche (Figure 4.1 B-E).

Les premières coupes ont été faites à 80 μm d'épaisseur (Figure 4.1 A-C). La visualisation des coupes nous a permis de voir le problème de pénétration de l'anticorps. Pour essayer d'améliorer la pénétration de l'anticorps, des coupes de 40 μm ont été effectuées (Figure 4.1 D-F). La pénétration des anticorps de MBP dans les coupes de 40 μm était meilleure (Figure 4.1). La plus grande amélioration était dans la matière blanche. Dans les coupes de 40 μm , seul un petit espace au centre n'est pas marqué, alors que dans les coupes de 80 μm , seulement quelques microns à la surface des coupes possédaient du marquage (Figure 4.1 A et

D). Puisque les anticorps de MBP ne pénétraient pas complètement, même dans les coupes plus minces, seulement la partie clairement marquée de chaque coupe a été considérée dans l'analyse de la colocalisation avec le traceur axonal Phal.

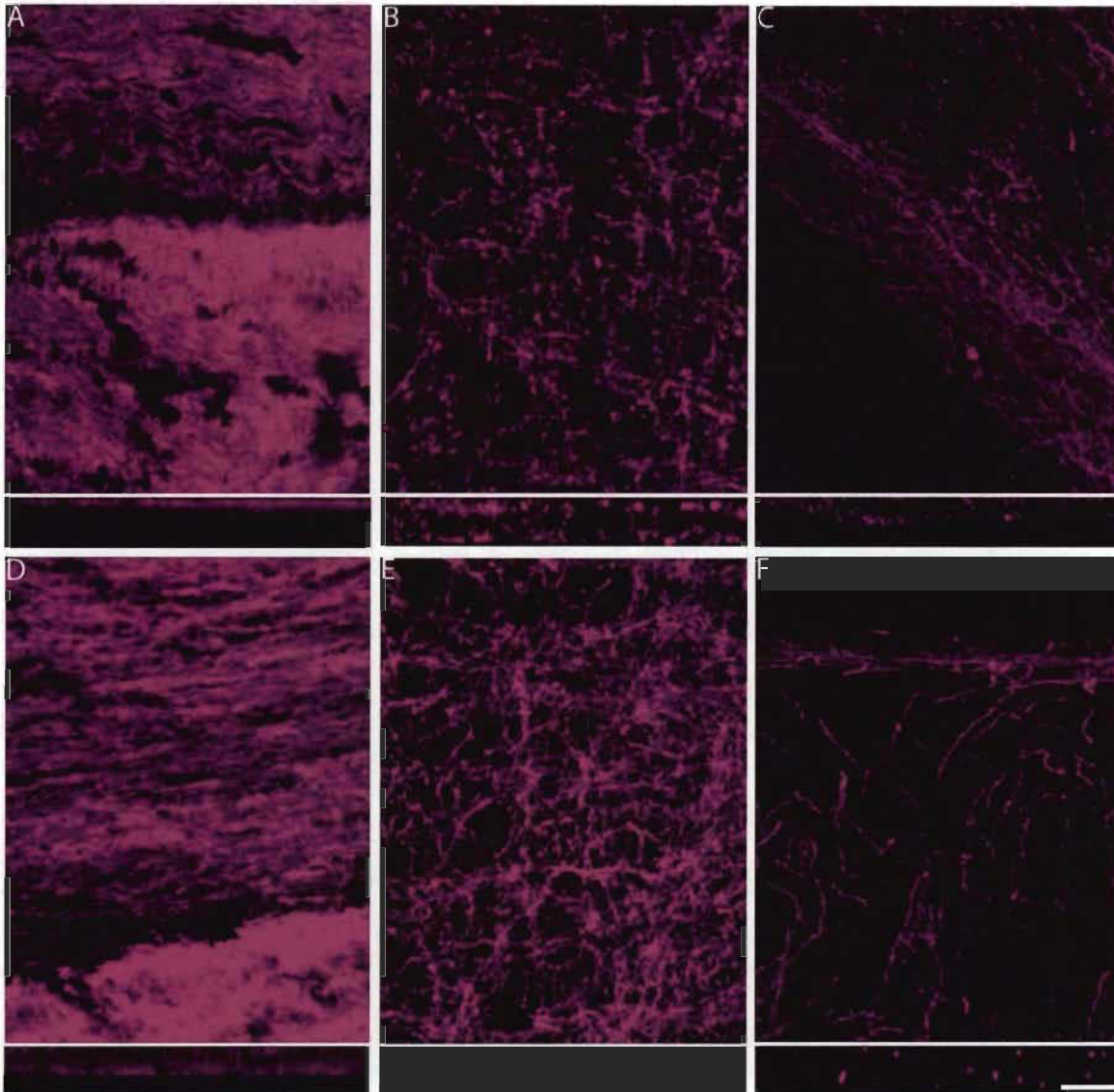


Figure 4.1. Photomicrographie de la pénétration de la myéline dans les coupes. A. Projection maximale et vue orthogonale en XZ du corps calleux, 80 μm . La vue orthogonale montre que le marquage ne se trouve que sur la surface de la coupe. B. Projection maximale et vue orthogonale en XZ de la couche 5, cortex V2M, 80 μm . La vue orthogonale montre que seulement un mince espace au centre de la coupe n'est pas marqué. C. Projection maximale et vue orthogonale en XZ du cortex RSG, 80 μm . La vue orthogonale montre que toute la coupe est bien marquée. D. Projection maximale et vue orthogonale en XZ du corps calleux, 40 μm . La vue orthogonale montre que le centre de la coupe est moins bien marqué que la surface. E. Projection maximale et vue orthogonale en XZ de la couche 5, cortex V2M, 40 μm . La vue orthogonale montre qu'un espace infime mal marqué est présent au centre de la coupe. F. Projection maximale et vue orthogonale en XZ de la couche 1 de V1, 40 μm . La vue orthogonale montre que le marquage est uniforme dans toute la coupe. Échelle : 20 μm .

L'anticorps de Phal pénétrait bien jusqu'au centre des coupes, autant dans la matière blanche que dans la matière grise, pour les deux épaisseurs de coupes (80 et 40 μm) (Figure 4.2). Les vues orthogonales démontrent la présence de Phal, même au centre des coupes.

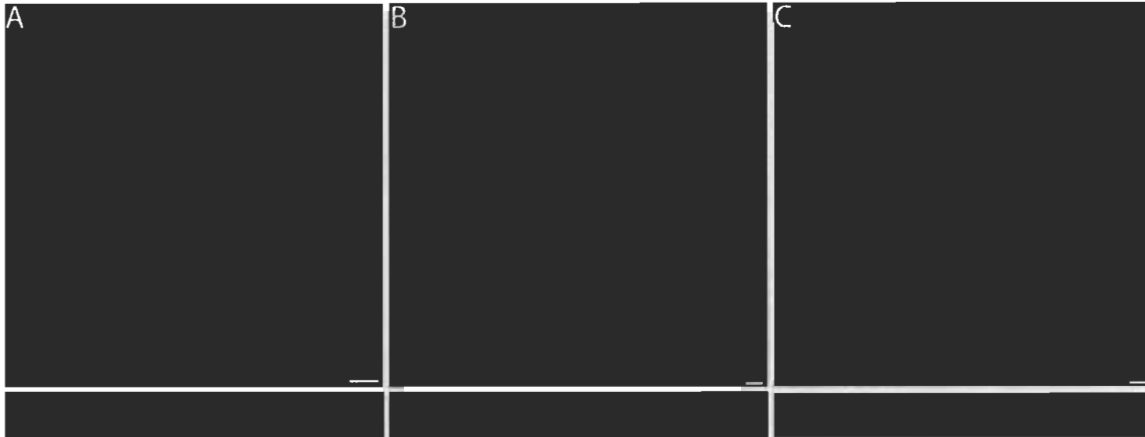


Figure 4.2. Photomicrographie de la pénétration du Phal dans les coupes. A. Projection maximale et vue orthogonale en XZ du corps calleux. B. Projection maximale et vue orthogonale en XZ de la couche 6, cortex V1. C. Projection maximale et vue orthogonale en XZ de la couche 1, cortex V1. L'épaisseur des coupes est de 80 μm . Échelle : 10 μm .

Structure sous-corticale

L'injection du traceur Phal dans V1 a produit des axones Phal+ dans la capsule interne et de nombreuses cibles sous-corticales connues, dont le DLG et les collicules supérieurs (Figure 4.3) (Froudarakis et al., 2019; Oh et al., 2014).

Dans le striatum, aucune colocalisation de MBP/Phal n'a été clairement observée (Figure 4.3 A et D). Les axones paraissent non doublement marqués et donc non myélinisés. La capsule interne est un peu plus ambiguë. Les axones entrant dans la capsule interne sont parallèles aux faisceaux de myéline (Figure 4.3 D). Ces axones Phal+ semblent être doublement marqués avec la MBP seulement lorsqu'ils sont noyés dans une forte densité de marquage de MBP. Hors du faisceau, aucune colocalisation de MBP/Phal n'est observée alors que, lorsqu'ils passent perpendiculairement aux faisceaux pyramidaux, ils semblent être doublement marqués (Figure 4.3 D flèche blanche).

Pour le DLG, des axones paraissant doublement marqués et non doublement marqués ont été observés (Figure 4.3 B et E). Les axones paraissant doublement marqués sont longs et un peu à l'écart d'une grande densité d'axones Phal+. Une grande densité d'axones non myélinisés est présente dans le DLG.

Pour les collicules supérieurs, la majorité des axones apparaissent non doublement marqués (Figure 4.3 C et F). Quelques axones paraissant doublement marqués sont visibles. Cependant, comme il est impossible de déterminer individuellement la myélinisation des axones, ces axones pourraient être soit myélinisés ou seulement noyés dans la densité du marquage. Les axones ne possédant pas de double marquage avec la MBP sont bien visibles.

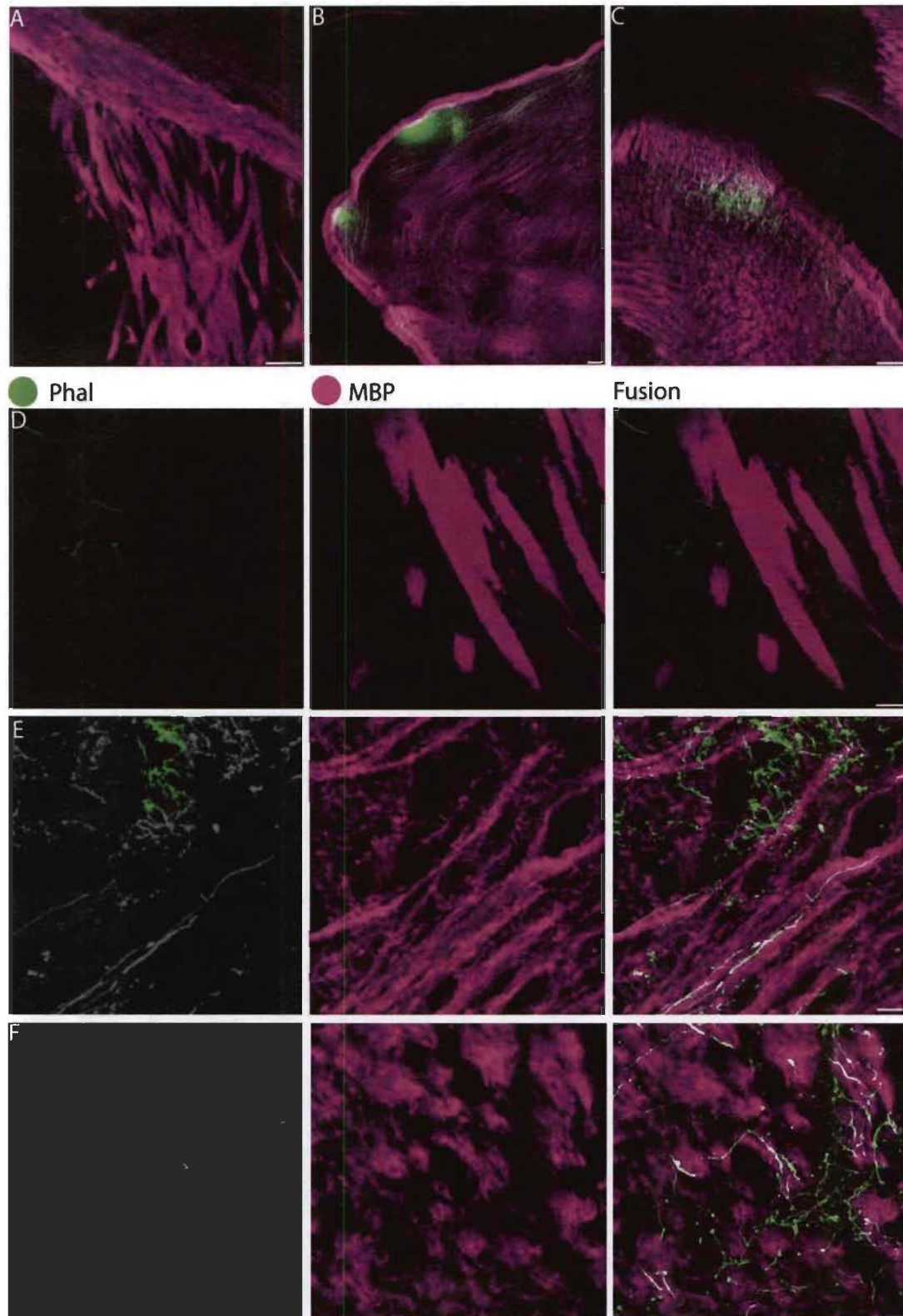


Figure 4.3. Photomicrographie de la matière blanche sous-corticale. La colonne de gauche montre le marquage du Phal ; celle du centre, le marquage du MBP et celle à droite, la superposition du Phal et MBP. A. Capsule interne (63x). B. Corps géniculé latéral dorsal (DLG). C. Collicules supérieurs (63x). D. Grossissement du striatum. E. Grossissement du DLG. F. Grossissement des collicules supérieurs. Échelle : A-C. 100 μ m ; D. 20 μ m ; E-F. 10 μ m.

Microscopie électronique

La majorité des axones marqués observés dans la matière blanche apparaissent doublement marqués. Ceci pourrait survenir qu'ils soient myélinisés ou pas, puisqu'un axone non myélinisé pourrait être trop près de plusieurs axones myélinisés, entrant alors dans la limite optique du microscope, et il serait impossible de connaître la véritable myélinisation de l'axone. De plus très peu d'axones doublement marqués ont été observés dans la matière grise. Ceci pourrait survenir si la gaine de myéline qui entoure les axones constituait une barrière qui compromettrait la pénétration des anticorps de Phal à travers celle-ci. Ainsi, si tel est le cas, seuls les axones ou des segments non myélinisés et les champs terminaux dépourvus de myéline des axones Phal+ seraient rendus visibles par la procédure immunohistochimique utilisée. Afin de lever cette ambiguïté, nous avons effectué une analyse ultrastructurale pour tester cette possibilité. Puisque la gaine de myéline est fortement composée de lipides, elle est électrodense et constitue une structure d'empilement de membranes caractéristiques, les axones myélinisés seront faciles à distinguer sans traitement immunohistochimique. Le marquage de Phal avec la DAB, qui résiste aux traitements des tissus requis pour la microscopie électronique, paraîtra gris foncé et devrait complètement remplir l'axone.

Dans le corps calleux, il a été possible de voir des axones Phal+ myélinisés et non myélinisés (Figure 4.4). Bien qu'aucun décompte n'ait été fait, la majorité des axones Phal+ observés en microscopie électronique sont myélinisés. Quelques axones Phal+ non myélinisés ont été observés au travers des axones myélinisés. Il est aussi plus évident de déterminer un axone Phal+ lorsqu'il est myélinisé. De plus, les gaines de myéline sont minces, entre 4 et 10 lamelles dans le corps calleux. Certains axones Phal+ myélinisés possèdent une mince gaine

de myéline, autour de 4 lamelles (Figure 4.4 D), alors que d'autres possèdent une gaine de myéline plus imposante, autour de 10 lamelles (Figure 4.4 E).

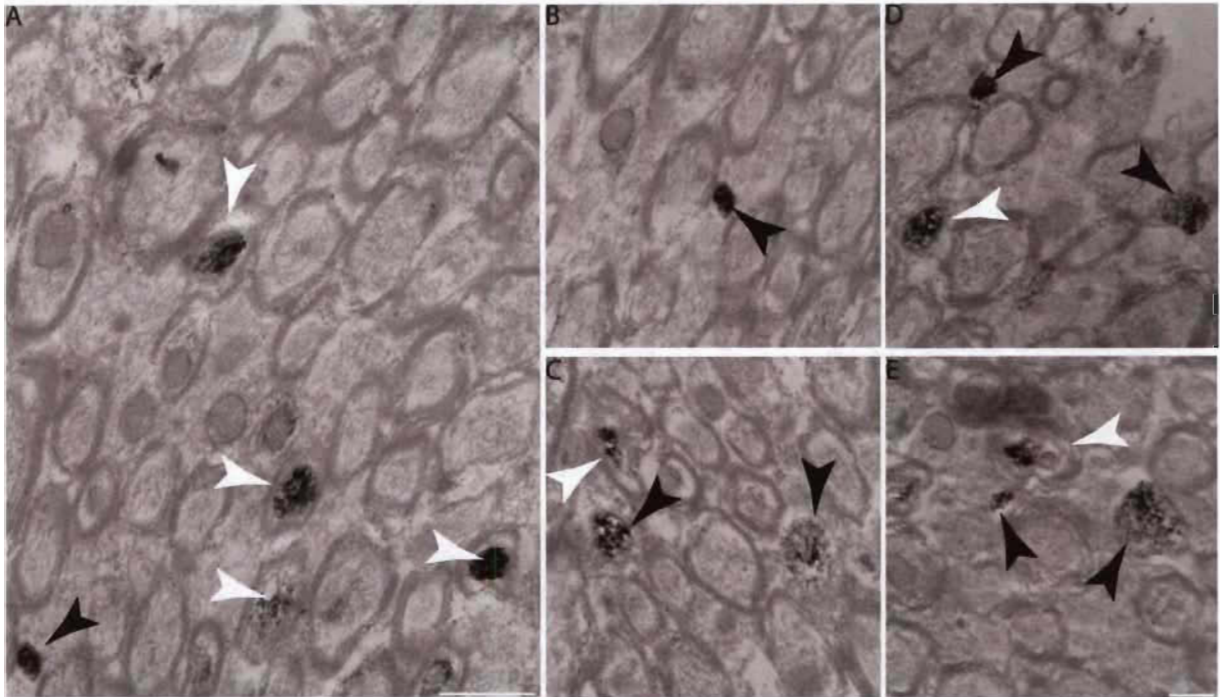


Figure 4.4. Photomicrographie du corps calleux en microscopie électronique.

A. Axones Phal+ myélinisés et non myélinisés démontrant qu'une majorité d'axones Phal+ myélinisés ont été vus dans le corps calleux. B. Grossissement des axones Phal+ non myélinisés de A. C-E. Axones Phal+ myélinisés et non myélinisés. Les flèches blanches pointent les axones Phal+ myélinisés. Les flèches noires pointent les axones Phal+ non myélinisés. L'axone myélinisé dans E possède environ 10 lamelles. L'axone myélinisé dans D possède environ 4 lamelles. Échelles : A. 800 nm ; B-E. 400 nm. Grossissements : A. 14 000 x ; B-E. 28 000 x.

Dans la capsule interne, directement sous le site d'injection, un mélange d'axones myélinisés et non myélinisés a été observé (Figure 4.5). Une majorité d'axones myélinisés a aussi été observée sous le site d'injection. Seulement quelques axones non myélinisés ont été observés. La gaine de myéline de ces axones varie en épaisseur d'environ 6 à 10 lamelles.

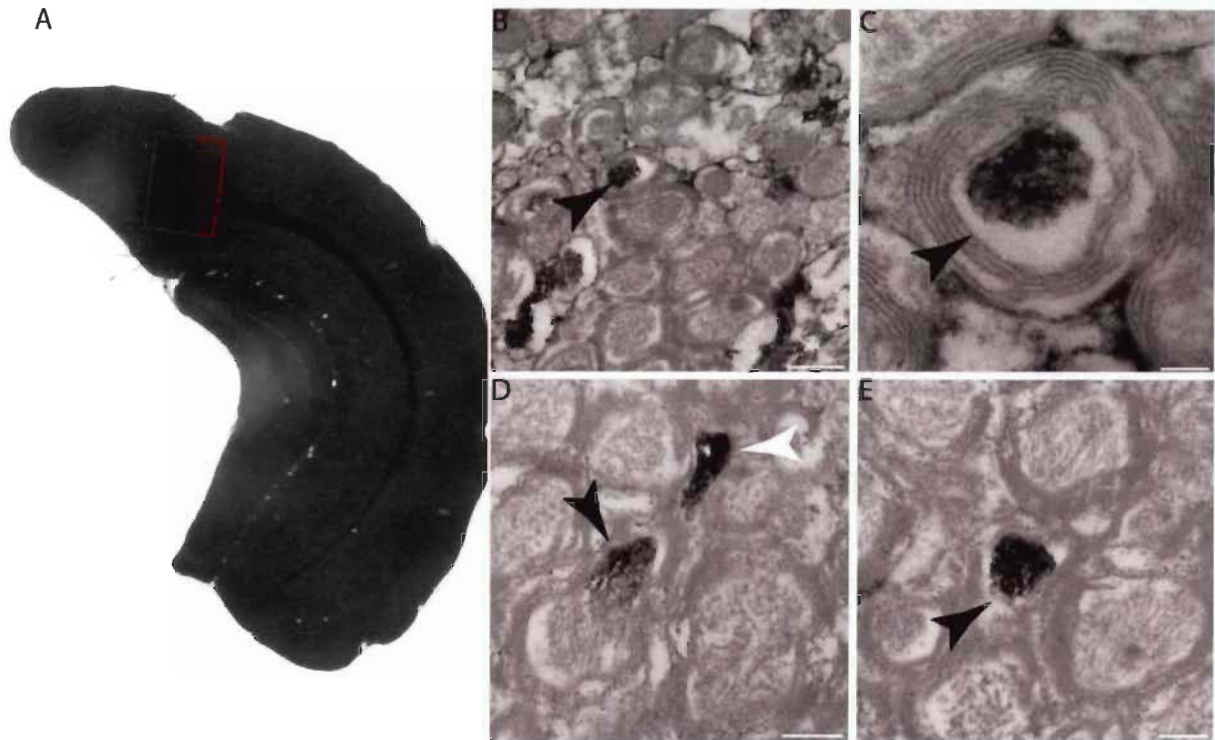


Figure 4.5. Photomicrographie de la matière blanche corticale sous V1 en microscopie électronique. A. Emplacement de la microscopie. B. Axone Phal+ myélinisé. C. Grossissement de l'axone Phal+ myélinisé en B. D. Axones Phal+ myélinisés et non myélinisés. E. Axone Phal+ myélinisé. Les flèches noires indiquent les axones Phal+ myélinisés. La flèche blanche indique l'axone Phal+ non myélinisé. Échelle : B. 600 nm; C. 100 nm; D-E. 400 nm. Grossissement : B. 18 000 x; C. 89 000 x; D-E. 28 000 x.

Chapitre 5 Discussion supplémentaire

Pénétration des anticorps

Les anticorps de MBP ont eu une mauvaise pénétration dans les coupes. La pénétration a été améliorée pour les coupes de 40 μm comparativement aux coupes de 80 μm . Cette faible pénétration pourrait être expliquée par la concentration des anticorps utilisés. Une concentration trop forte d'anticorps peut empêcher une bonne pénétration (Figure 5.1). Lorsqu'un trop grand nombre d'anticorps pénètre en même temps dans le tissu, ils produisent alors une barrière qui peut empêcher d'autres anticorps de pénétrer dans le tissu (Johnson, 2020). En général, lors d'une trop forte concentration d'anticorps, le marquage est fort à la surface de la coupe et très faible au centre des coupes (Johnson, 2020), exactement comme observées dans nos résultats. Les anticorps de MBP ont été utilisés avec une concentration de 1 : 1000, comme recommandé par le fabricant (Abcam). Des tests à des concentrations de 1 : 2000 ont été faits avant de décider sur la concentration de 1 : 1000. Cette concentration n'a pas été retenue, car le marquage était trop faible. Pour essayer d'améliorer la pénétration de l'anticorps dans le tissu, une concentration intermédiaire pourrait être utilisée.

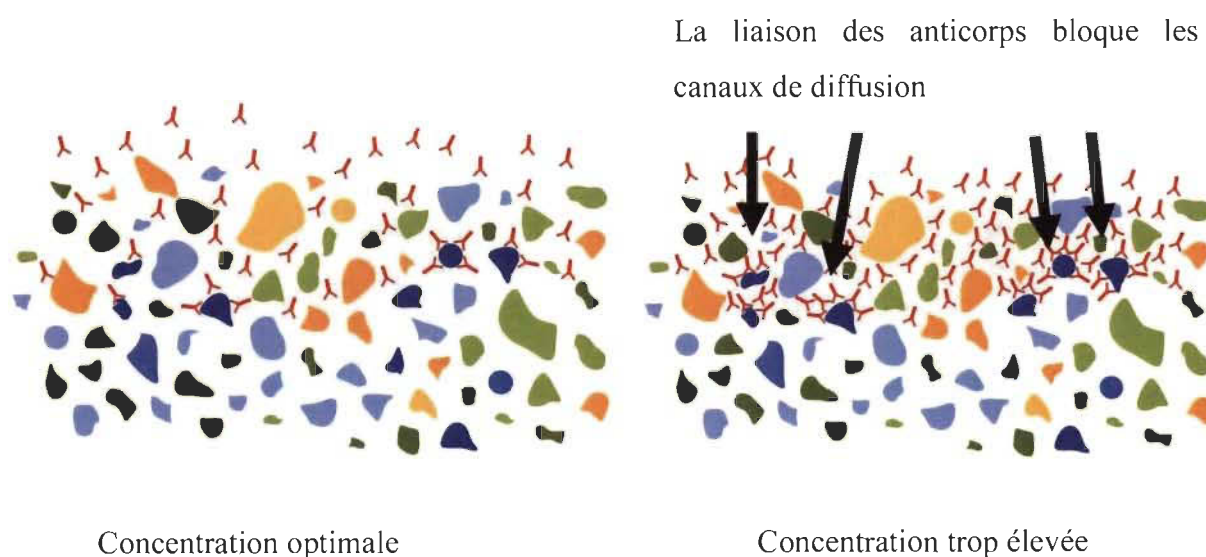


Figure 5.1. Blocage de la diffusion par les anticorps. Adapté de Johnson (2020) (Abcam).

Les anticorps de Phal ont bien pénétré dans les coupes et ont produit un marquage intense qui remplit le cytoplasme des axones. Ce marquage a permis de voir des axones dans toute l'épaisseur de la coupe. Aucune incertitude n'a donc été présente pour le marquage de Phal. La concentration utilisée pour les anticorps de Phal était donc optimale, puisque le marquage était homogène et bien distribué (Johnson, 2020).

Microscopie photonique

Les résultats démontrent que les axones marqués des projections efférentes corticocorticales ipsilatérales du cortex visuel primaire ne sont pas myélinisés chez la souris. Ce résultat cependant, pourrait être expliqué si l'anticorps anti-Phal n'était pas capable de traverser la gaine de myéline des axones. Ainsi tous les axones seraient Phal- dans leurs portions myélinisées et Phal+ seulement dans leurs portions non myélinisées. Deux études indiquent que la myéline agit comme une barrière à la pénétration des réactifs (Anderson & Martin, 2006; Tamas et al., 1997). Dans l'étude de Tamas et al. (1997), les axones du cortex visuel du chat ont été remplis avec de la biocytine. Ils indiquent que les réactifs pour la biocytine ne traversent pas les gaines de myéline, mais qu'il est possible de suivre les axones en utilisant les nœuds de Ranvier. Dans l'étude de Anderson et Martin (2006), les axones provenaient de la connexion entre V1 et V4 chez le macaque (*Macaca mulatta*). Ils ont utilisé le traceur biotine dextran amine (BDA) pour marquer ces axones. En microscopie électronique, seulement la synapse était marquée, alors que l'axone en soi ne l'était pas. Cependant, contrairement à cette étude, des axones myélinisés marqués par du Phal ont déjà été documentés chez le rat en microscopie électronique dans le globus pallidus et la substance noire des régions sous-corticales (Kita &

Kitai, 1987). Cette étude porte à croire que le Phal marque les axones malgré la présence d'une gaine de myéline. La microscopie électronique effectuée lors de cette étude démontre que la myéline des axones dans la matière blanche sous le site d'injection possède autour de 6 lamelles. Cette myélinisation de quelques lamelles chez la souris correspond à ce qui a été constaté dans d'autres études (Hoogland et al., 1991). La faible épaisseur de la gaine de myéline des axones observés ici et le marquage évident du Phal électrodense dans des axones clairement myélinisés observés en microscopie électronique démontrent que les anticorps du Phal pénètrent dans les axones myélinisés. La myéline ne serait donc pas une barrière aux anticorps du Phal. Puisque les anticorps de Phal pénètrent les axones myélinisés, les résultats de microscopie photonique, qui montre des axones sans myéline, sont valides.

Les axones ipsilatéraux cheminant dans la matière grise ne sont majoritairement pas myélinisés. Les fibres tangentielles des couches corticales 5 et 6 pourraient être des axones corticocorticaux d'autres cortex ou des axones cortico-thalamiques cheminant dans la matière grise avant de s'enfoncer dans les régions sous-corticales. De futures recherches sur la nature de ces axones sont nécessaires pour répondre à cette question.

Les axones efférents corticocorticaux ipsilatéraux vont aux aires extrastriées (Olavarria & Montero, 1989; Wang et al., 2012). Puisque ces axones ne semblent pas myélinisés, la myéline n'est probablement pas nécessaire pour la synchronisation du signal entre les aires extrastriées. Aucune étude n'a cependant prouvé cette suggestion. Le cerveau de la souris est petit. Le rôle de la myéline pourrait différer selon la nature des axones myélinisés. Par exemple, la raison principale de la myélinisation des neurones GABAergiques PV+ n'est probablement pas d'augmenter la vitesse de conduction dans l'axone, puisque ce sont des axones qui

établissent des connexions locales courtes (Micheva et al., 2016). La non-myélinisation des axones efférents corticocorticaux ipsilatéraux provenant de V1 pourrait indiquer qu'une augmentation de la vitesse de conduction n'est pas nécessaire pour l'intégration du signal. Au contraire, pour bien intégrer l'information, la vitesse optimale de ces axones pourrait probablement être atteinte seulement par une modification du diamètre de l'axone.

Microscopie électronique

L'analyse ultrastructurale du corps calleux a permis de démontrer qu'une partie des axones Phal+ sont myélinisés. Ces résultats pourraient être expliqués par la distance que les axones controlatéraux doivent parcourir. Puisque le chemin est plus grand à parcourir pour aller au cortex controlatéral, la myélinisation de certains axones pourrait permettre que le signal arrive plus rapidement. Ce faisant, l'influx arriverait à temps pour une intégration optimale du signal. Comme tous les axones ne sont pas myélinisés, les axones non myélinisés n'ont probablement pas besoin que le signal arrive plus rapidement, mais plus tôt au bon moment. Une vitesse plus rapide n'est pas toujours la bonne solution, mais plutôt que l'axone possède la vitesse optimale (Pajevic et al., 2014).

L'analyse ultrastructurale de la capsule externe sous le site d'injection a permis de démontrer qu'une partie des axones Phal+ sont myélinisés. Ces axones peuvent être des axones cortico-thalamiques ou controlatéraux, puisque les axones qui contribuent aux projections corticocorticales controlatérales cheminent dans la matière blanche alors que les corticocorticales ipsilatérales cheminent dans la matière grise (Watakabe & Hirokawa, 2018).

Structures sous-corticales

La majorité des axones dans les champs terminaux des structures sous-corticales ipsilatérales (Striatum, capsule interne, DLG et collicules supérieurs) ne semblent pas myélinisés. Quelques axones, qui pourraient être myélinisés, ont été aperçus dans la capsule interne, le DLG et les collicules supérieurs. Puisque leur myélinisation est ambiguë, il faudrait la vérifier en microscopie électronique. Dans les champs terminaux, les axones peuvent devoir faire des connexions synaptiques, ce qui pourrait expliquer que peu d'axones myélinisés ont été trouvés, puisque la myéline empêche les connexions entre les neurones (Braitenberg, 1962; Turner, 2019). Le chemin menant aux champs terminaux n'a pas été observé pour les structures sous-corticales. Pour savoir s'ils sont réellement myélinisés, il faudrait suivre les axones sous-corticaux à partir du site d'injection jusque dans les champs terminaux et les caractériser dans leurs chemins.

Fonction de la myéline

Puisque les axones efférents corticocorticaux ipsilatéraux sont majoritairement non myélinisés et que certains axones présents dans la matière blanche sont myélinisés, la myéline pourrait avoir comme fonction principale sur ces axones d'accélérer la vitesse de conduction. La myélinisation entre le thalamus et le cortex sert à diminuer le temps que l'axone prend à se rendre à plusieurs cortex (Salami et al., 2003). Cette fonction pourrait être la même pour les axones corticocorticaux. Le signal a moins de chemin à parcourir pour se rendre dans les destinations ipsilatérales que controlatérales. Pour une bonne intégration de l'influx nerveux, une vitesse optimale doit être obtenue (Pajevic et al., 2014). Cette vitesse optimale est modulée par la présence de myéline. La présence de myélinisation pour les axones controlatéraux pourrait

signifier un besoin de synchronisation entre le signal envoyé ipsilatéralement et controlatéralement.

Limitation

Bien que leur diamètre n'ait pas été vérifié, les axones observés sont très petits. La microscopie photonique possède une limite de résolution de 2 μm . Il est donc impossible de distinguer les différentes structures plus petites que 2 μm . Cette limitation explique la difficulté liée à la matière blanche. Les axones sont tellement proches les uns des autres qu'il est impossible de les différencier. Il est donc difficile de s'assurer de la myélinisation réelle des axones apparaissant marqués dans la matière blanche.

De plus, la faible quantité d'axones marqués rendait difficiles leurs observations en microscopie électronique. La microscopie électronique a donc été limitée à la matière blanche et aux corps calleux, puisque la densité d'axones marqués est plus forte dans ces zones. Il n'a donc pas été possible de vérifier la myélinisation des axones en microscopie électronique dans la matière grise.

De plus, une différence existe entre les primates et les souris. Le cerveau murin est plus petit et comporte près de 46 % d'axones non myélinisés alors que le cerveau du primate ne possède qu'environ 10 % d'axones non myélinisés (Partadiredja et al., 2003). Les études sur le cerveau murin permettent de mieux connaître la différence entre la souris et le primate, ce qui peut permettre de mieux comprendre les effets de certaines maladies humaines sur la souris. Il est important de connaître la différence entre les cerveaux. Les différences entre primate et rongeur pourraient s'expliquer par un câblage différent, puisque chez la souris les axones corticocorticaux ne cheminent pas aux mêmes endroits que chez le primate. En effet, chez la

souris les axones corticocorticaux cheminent dans la matière grise (Watakabe & Hirokawa, 2018), alors que chez les primates ces axones cheminent dans la matière blanche (Schuz & Braitenberg, 2002). De plus, le cerveau du primate étant définitivement plus gros que celui de la souris, il est possible que les axones nécessitent une plus forte myélinisation, puisqu'elles ont plus de distance à parcourir.

Perspectives futures

Cette étude portait uniquement sur la myélinisation des axones corticocorticaux efférents du cortex visuel primaire. Pour avoir une vision plus globale de la myélinisation dans le cerveau, il serait possible de regarder la myélinisation des autres aires sensorielles. Par exemple, l'étude de Osanai et al. (2017) a démontré qu'il y avait des axones myélinisés dans le corps calleux provenant du cortex sensoriel de la souris. Il serait pertinent de connaître s'il y a une différence entre les axones ipsilatéraux et controlatéraux pour ce cortex. De plus, les cortex moteurs et frontaux pourraient avoir différents degrés de myélinisation qui sont actuellement inconnus.

Chapitre 6 Conclusion

Cette étude a démontré que les axones efférents corticocorticaux ipsilatéraux provenant de V1 qui cheminent dans la matière grise corticale étaient majoritairement non myélinisés. Les projections corticocorticales contralatérales qui cheminent dans la matière blanche sont constituées d'axones myélinisés et aussi d'axones non myélinisés. Les axones efférents sous-corticaux provenant de V1 seraient en partie non myélinisés avec certains axones probablement myélinisés. Plus de recherches seraient nécessaires pour s'assurer de la myélinisation des axones sous-corticaux provenant de V1. Nos résultats indiquent qu'il y aurait une différence de myélinisation entre les axones corticocorticaux ipsilatéraux et contralatéraux. Cette différence pourrait indiquer un besoin d'augmenter la vitesse de conduction pour les axones calleux, ce qui permettrait une synchronisation entre les hémisphères cérébraux. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

Dans cette étude, seulement les axones corticocorticaux du cortex visuel primaire ont été observés. Puisque les aires extrastriées du système visuel sont toutes équivalentes en distance de V1 chez la souris, la myéline ne serait pas nécessaire pour les axones corticocorticaux ipsilatéraux partant de V1 pour se rendre dans les aires extrastriées. Il n'a pas été étudié si les axones partant des aires extrastriées pour se diriger vers V1 sont myélinisés. Cependant, cette caractéristique n'est pas présente pour tous les cortex et V1 n'est peut-être pas représentatif de tous les cortex sensoriels. Il est encore inconnu si les axones corticocorticaux ipsilatéraux des autres cortex sont non myélinisés. D'autres cortex sensoriels, comme le cortex somatosensoriel ou olfactif, ou les cortex moteurs et préfrontaux pourraient avoir des axones myélinisés ipsilatéralement.

Dans un contexte où la recherche sur la sclérose en plaques est en effervescence, mieux comprendre la nature des axones myélinisés permettrait d'augmenter notre compréhension de cette maladie. Ces études permettraient de connaître les différences entre le cerveau de souris et celui des humains, permettant ainsi de mieux transposer les recherches faites sur les maladies humaines, comme la sclérose en plaques.

Peu d'études ont regardé la myélinisation des axones individuels. Il a été supposé que les axones pyramidaux de longues distances soient myélinisés, cependant très peu d'étude démontre leurs myélinisations. Puisqu'il y a peu de connaissances sur la nature des axones myélinisés, excluant les études sur les axones GABAergiques, il est primordial d'augmenter nos connaissances sur le sujet. Ces connaissances permettraient d'améliorer la compréhension des problèmes cognitifs importants causés entre autres par la sclérose en plaques et la schizophrénie.

Bibliographie

- Abcam. (2020). Product datasheet: Anti-Myelin Basic Protein antibody ab40390.
- Amir, A., Paré, J. F., Smith, Y., & Paré, D. (2019). Midline thalamic inputs to the amygdala: Ultrastructure and synaptic targets. *J Comp Neurol*, 527(5), 942-956. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.24557>
- Anderson, J. C., & Martin, K. A. (2006). Synaptic connection from cortical area V4 to V2 in macaque monkey. *J Comp Neurol*, 495(6), 709-721. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20914>
- Avendaño, C., Stepniewska, I., Rausell, E., & Reinoso-Suárez, F. (1990). Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience*, 39(3), 547-559. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90242-v](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(90)90242-v)
- Baron, W., & Hoekstra, D. (2010). On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett*, 584(9), 1760-1770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.085>
- Barrera, K., Chu, P., Abramowitz, J., Steger, R., Ramos, R. L., & Brumberg, J. C. (2013). Organization of myelin in the mouse somatosensory barrel cortex and the effects of sensory deprivation. *Dev Neurobiol*, 73(4), 297-314. <http://dx.doi.org/10.1002/dneu.22060>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neurosciences à la découverte du cerveau* (A. Nieoullon, Trad. 4e éd.). Paris : Les éditions Pradel.
- Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015). Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell*, 32(4), 447-458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>
- Blakemore, C., Diao, Y. C., Pu, M. L., Wang, Y. K., & Xiao, Y. M. (1983). Possible functions of the interhemispheric connexions between visual cortical areas in the cat. *J Physiol*, 337, 331-349. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014627>
- Bouhsira, É. (2007). *Intéraction zinc-glutamate dans l'hyppocampe dorsal de la souris* (Doctorat). Disponible chez ProQuest Dissertations & Theses Full Text.
- Bove, R. M., & Green, A. J. (2017). Remyelinating Pharmacotherapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 14(4), 894-904. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-017-0577-0>
- Braitenberg, V. (1962). A note on myeloarchitectonics. *J Comp Neurol*, 118, 141-156. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901180202>
- Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A. B., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., & Rossi, F. (2000). Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of

- uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci*, 20(6), 2275-2286. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.20-06-02275.2000>
- Calabrese, M., & Castellaro, M. (2017). Cortical Gray Matter MR Imaging in Multiple Sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am*, 27(2), 301-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nic.2016.12.009>
- Calver, A. R., Hall, A. C., Yu, W. P., Walsh, F. S., Heath, J. K., Betsholtz, C., & Richardson, W. D. (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron*, 20(5), 869-882. [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80469-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80469-9)
- Caputi, A., Melzer, S., Michael, M., & Monyer, H. (2013). The long and short of GABAergic neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 23(2), 179-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.021>
- Carey, R. G., Fitzpatrick, D., & Diamond, I. T. (1979a). Layer I of striate cortex of *Tupaia glis* and *Galago senegalensis*: projections from thalamus and claustrum revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 186(3), 393-437. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901860306>
- Carey, R. G., Fitzpatrick, D., & Diamond, I. T. (1979 b). Thalamic projections to layer I of striate cortex shown by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Science*, 203(4380), 556-559. <http://dx.doi.org/10.1126/science.760205>
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S. Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A. S., Davidson, T. J., . . . Deisseroth, K. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449), 332-337. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12107>
- Clarke, A., Eberhardt, C., & Eberhardt, C. N. (2002). *Microscopy techniques for materials science*: Woodhead Publishing.
- Clasca, F., Porrero, C., Galazo, M. J., Rubio-Garrido, P., & Evangelio, M. (2016). Anatomy and development of multispecific thalamocortical axons: Implications for cortical dynamics and evolution. Dans K. S. Rockland (Éd.), *Axons and brain architecture*. (pp. 70-92): Elsevier.
- Coogan, T. A., & Burkhalter, A. (1990). Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex. *Exp Brain Res*, 80(1), 49-53. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00228846>
- Coogan, T. A., & Burkhalter, A. (1993). Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J Neurosci Methods*, 13(9), 3749-3772.
- Coogan, T. A., & Van Essen, D. C. (1996). Development of connections within and between areas V1 and V2 of macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 372(3), 327-342. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19960826\)372:3<327::Aid-cne1>3.0.Co;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19960826)372:3<327::Aid-cne1>3.0.Co;2-4)

- Craig, A. S. (1974). Sodium borohydride as an aldehyde blocking reagent for electron microscope histochemistry. *Histochemistry*, 42(2), 141-144. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00533265>
- Cucchiaro, J. B., & Uhrich, D. J. (1990). Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L): a neuroanatomical tracer for electron microscopic analysis of synaptic circuitry in the cat's dorsal lateral geniculate nucleus. *J Electron Microsc Tech*, 15(4), 352-368. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.1060150405>
- Cummings, R. D., Trowbridge, I. S., & Kornfeld, S. (1982). A mouse lymphoma cell line resistant to the leucoagglutinating lectin from Phaseolus vulgaris is deficient in UDP-GlcNAc: alpha-D-mannoside beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*, 257(22), 13421-13427.
- Deshmukh, V. A., Tardif, V., Lyssiotis, C. A., Green, C. C., Kerman, B., Kim, H. J., . . . Lairson, L. L. (2013). A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature*, 502(7471), 327-332. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12647>
- Drouin, H. (1984). On microelectrode ionophoresis. *Biophysical journal*, 46(5), 597-604.
- Duncan, D. (1934). The importance of diameter as a factor in myelination. *Science*, 79(2051), 363. <http://dx.doi.org/10.1126/science.79.2051.363>
- Froudarakis, E., Fahey, P. G., Reimer, J., Smirnakis, S. M., Tehovnik, E. J., & Tolia, A. S. (2019). The Visual Cortex in Context. *Annu Rev Vis Sci*, 5, 317-339. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034407>
- Gades, N. M., Danneman, P. J., Wixson, S. K., & Tolley, E. A. (2000). The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 39(2), 8-13.
- Gallo, V., Zhou, J. M., McBain, C. J., Wright, P., Knutson, P. L., & Armstrong, R. C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci*, 16(8), 2659-2670.
- Garcia-Mirallas, M., Yusof, N., Tan, J. Y., Radulescu, C. I., Sidik, H., Tan, L. J., . . . Pouladi, M. A. (2019). Laquinimod Treatment Improves Myelination Deficits at the Transcriptional and Ultrastructural Levels in the YAC128 Mouse Model of Huntington Disease. *Mol Neurobiol*, 56(6), 4464-4478. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1393-1>
- Gerfen, C. R., & Sawchenko, P. E. (1984). An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus

- vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res*, 290(2), 219-238. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90940-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90940-5)
- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., . . . Monje, M. (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1252304>
- Glasser, M. F., Goyal, M. S., Preuss, T. M., Raichle, M. E., & Van Essen, D. C. (2014). Trends and properties of human cerebral cortex: correlations with cortical myelin content. *Neuroimage*, 93 Pt 2, 165-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.03.060>
- Glasser, M. F., & Van Essen, D. C. (2011). Mapping human cortical areas in vivo based on myelin content as revealed by T1- and T2-weighted MRI. *J Neurosci*, 31(32), 11597-11616. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2180-11.2011>
- Grados-Munro, E. M., & Fournier, A. E. (2003). Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *J Neurosci Res*, 74(4), 479-485. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.10803>
- Hamilton, N. B., Clarke, L. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Karadottir, R., . . . Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, 65(2), 309-321. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23093>
- Hammarstrom, S., Hammarstrom, M. L., Sundblad, G., Arnarp, J., & Lonngren, J. (1982). Mitogenic leucoagglutinin from Phaseolus vulgaris binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(5), 1611-1615. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.79.5.1611>
- Harris, J. A., Mihalas, S., Hirokawa, K. E., Whitesell, J. D., Choi, H., Bernard, A., . . . Zeng, H. (2019). Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity. *Nature*, 575(7781), 195-202. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1716-z>
- Harris, J. J., & Attwell, D. (2012). The energetics of CNS white matter. *J Neurosci*, 32(1), 356-371. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3430-11.2012>
- Hartline, D. K., & Colman, D. R. (2007). Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol*, 17(1), R29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.042>
- Higo, S., Akashi, K., Sakimura, K., & Tamamaki, N. (2009). Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front Neuroanat*, 3, 25. <http://dx.doi.org/10.3389/neuro.05.025.2009>
- Higo, S., Udaka, N., & Tamamaki, N. (2007). Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. *J Comp Neurol*, 503(3), 421-431. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21395>

- Hill, R. A., Li, A. M., & Grutzendler, J. (2018). Lifelong cortical myelin plasticity and age-related degeneration in the live mammalian brain. *Nat Neurosci*, 21(5), 683-695. <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0120-6>
- Hinova-Palova, D. V., Edelstein, L., Landzhov, B. V., Braak, E., Malinova, L. G., Minkov, M., . . . Ovtcharoff, W. (2014). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human claustrum. *Brain Struct Funct*, 219(5), 1813-1830. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-013-0603-x>
- Höftberger, R., & Lassmann, H. (2017). Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*, 145, 263-283. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802395-2.00019-5>
- Hoogland, P. V., Wouterlood, F. G., Welker, E., & Loos, H. V. d. (1991). Ultrastructure of giant and small thalamic terminals of cortical origin: a study of the projections from the barrel cortex in mice using Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin (PHA-L). *Experimental Brain Research*, 87, 159-172.
- Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., & Bergles, D. E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci*, 16(6), 668-676. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3390>
- Huttner, W. B., & Zimmerberg, J. (2001). Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr Opin Cell Biol*, 13(4), 478-484. [http://dx.doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00239-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00239-8)
- Ishikawa, A. W., Komatsu, Y., & Yoshimura, Y. (2018). Experience-Dependent Development of Feature-Selective Synchronization in the Primary Visual Cortex. *J Neurosci*, 38(36), 7852-7869. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0027-18.2018>
- Jahn, O., Tenzer, S., & Werner, H. B. (2009). Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol*, 40(1), 55-72. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-009-8071-2>
- Johnson, M. (2020). Tissue clearing : optimizing tissue thickness and antibody concentration. *Tissue clearing made easy*. Page consultée à https://www.abcam.com/kits/tissue-clearing-methods-and-reagents?utm_source=Eloqua&utm_medium=Email&utm_campaign=Neuroscience%7CEngage%7C2020-01-27%2019%3A00%3A00.000%7CN%2FA%7CGLOBAL%7CEN%7CAutomated%20%20Research%20Area&utm_content=Neuroscience%7c&mi_u=827463#Methods%20and%20tips

- Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C. W., & Hama, K. (1988). Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 72(2), 347-362. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00250256>
- Kita, H., & Kitai, S. T. (1987). Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol*, 260(3), 435-452. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902600309>
- Kita, H., Kosaka, T., & Heizmann, C. W. (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res*, 536(1-2), 1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90002-s](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(90)90002-s)
- Klingseisen, A., & Lyons, D. A. (2018). Axonal Regulation of Central Nervous System Myelination: Structure and Function. *Neuroscientist*, 24(1), 7-21. <http://dx.doi.org/10.1177/1073858417703030>
- Kuypers, H. G., Szwarcbart, M. K., Mishkin, M., & Rosvold, H. E. (1965). OCCIPITOTEMPORAL CORTICOCORTICAL CONNECTIONS IN THE RHESUS MONKEY. *Exp Neurol*, 11, 245-262. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(65\)90016-6](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(65)90016-6)
- Lai, J., Legault, M. A., Thomas, S., & Casanova, C. (2015). Simultaneous Electrophysiological Recording and Micro-injections of Inhibitory Agents in the Rodent Brain. *J Vis Exp*(101), e52271. <http://dx.doi.org/10.3791/52271>
- Lanciego, J. L., & Wouterlood, F. G. (2020). Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral. *Brain Struct Funct*, 225(4), 1193-1224. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-020-02041-6>
- Levitt, J. B., Lewis, D. A., Yoshioka, T., & Lund, J. S. (1993). Topography of pyramidal neuron intrinsic connections in macaque monkey prefrontal cortex (areas 9 and 46). *J Comp Neurol*, 338(3), 360-376. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903380304>
- Lima, J. D., Sobrinho, C. R., Falquetto, B., Santos, L. K., Takakura, A. C., Mulkey, D. K., & Moreira, T. S. (2019). Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus modulate breathing in rats by direct projections to the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol*, 597(7), 1919-1934. <http://dx.doi.org/10.1113/jp277617>
- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J., . . . Casaccia, P. (2012). Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-1623. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3263>
- Lozano, A. M., Schmidt, M., & Roach, A. (1995). A convenient in vitro assay for the inhibition of neurite outgrowth by adult mammalian CNS myelin using immortalized neuronal cells. *J Neurosci Methods*, 63(1-2), 23-28. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00081-x](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(95)00081-x)

- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, *47*(6), 707-717.
- Lund, J. S., Yoshioka, T., & Levitt, J. B. (1993). Comparison of intrinsic connectivity in different areas of macaque monkey cerebral cortex. *Cereb Cortex*, *3*(2), 148-162. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/3.2.148>
- Lund, R. D. (1964). Terminal distribution in the superior colliculus of fibres originating in the visual cortex. *Nature*, *204*, 1283-1285. <http://dx.doi.org/10.1038/2041283a0>
- Luo, L. (2016). *Principles of neurobiology*. New York : Garland Science.
- Massé, I., Régnier, P., & Boire, D. (2016). Geometrical Structure of Single Axons of Visual Corticocortical Connections in the Mouse *Axons and brain architecture* (pp. 426). Academic Press: Elsevier.
- McDonald, C. T., & Burkhalter, A. (1993). Organization of long-range inhibitory connections with rat visual cortex. *J Neurosci*, *13*(2), 768-781. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.13-02-00768.1993>
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J. P., Emery, B., Tohyama, K., & Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, *346*(6207), 318-322. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254960>
- Melzer, S., Gil, M., Koser, D. E., Michael, M., Huang, K. W., & Monyer, H. (2017). Distinct Corticostriatal GABAergic Neurons Modulate Striatal Output Neurons and Motor Activity. *Cell Rep*, *19*(5), 1045-1055. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.024>
- Micheva, K. D., Wolman, D., Mensh, B. D., Pax, E., Buchanan, J., Smith, S. J., & Bock, D. D. (2016). A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *Elife*, *5*, 1-29. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.15784>
- Mize, R. R. (1988). Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the cat superior colliculus. *J Comp Neurol*, *276*(2), 169-187. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902760203>
- Montero, V. M. (1993). Retinotopy of cortical connections between the striate cortex and extrastriate visual areas in the rat. *Exp Brain Res*, *94*(1), 1-15. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00230466>
- Moore, J. W., Joyner, R. W., Brill, M. H., Waxman, S. D., & Najar-Joa, M. (1978). Simulations of conduction in uniform myelinated fibers. Relative sensitivity to changes in nodal and internodal parameters. *Biophys J*, *21*(2), 147-160. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495\(78\)85515-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(78)85515-5)

- Morell, P., & Norton, W. T. (1980). Myelin. *Scientific american*, 242(5), 88-119. <http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican0580-88>
- Najm, F. J., Madhavan, M., Zaremba, A., Shick, E., Karl, R. T., Factor, D. C., . . . Tesar, P. J. (2015). Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature*, 522(7555), 216-220. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14335>
- Nave, K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321), 244-252. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09614>
- Nave, K. A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 503-533. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Nguyen, H. T. H., Wood, R. J., Prawdiuk, A. R., Furness, S. G. B., Xiao, J., Murray, S. S., & Fletcher, J. L. (2019). TrkB Agonist LM22A-4 Increases Oligodendroglial Populations During Myelin Repair in the Corpus Callosum. *Front Mol Neurosci*, 12, 205. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2019.00205>
- Nieuwenhuys, R. (2013). The myeloarchitectonic studies on the human cerebral cortex of the Vogt-Vogt school, and their significance for the interpretation of functional neuroimaging data. *Brain Struct Funct*, 218(2), 303-352. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-012-0460-z>
- Nieuwenhuys, R., Broere, C. A., & Cerliani, L. (2015). A new myeloarchitectonic map of the human neocortex based on data from the Vogt-Vogt school. *Brain Struct Funct*, 220(5), 2551-2573. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-014-0806-9>
- Nogales, E. (2009). Introduction to Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy. Page consultée à <https://www.ibiology.org/techniques/transmission-electron-microscopy/>
- Odackal, J., Colbourn, R., Odackal, N. J., Tao, L., Nicholson, C., & Hrabetova, S. (2017). Real-time Iontophoresis with Tetramethylammonium to Quantify Volume Fraction and Tortuosity of Brain Extracellular Space. *J Vis Exp*(125). <http://dx.doi.org/10.3791/55755>
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., . . . Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207-214. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13186>
- Olavarria, J., & Montero, V. M. (1989). Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections. *Vis Neurosci*, 3(1), 59-69. <http://dx.doi.org/10.1017/s0952523800012517>

- Olavarria, J., & Van Sluyters, R. C. (1983). Widespread callosal connections in infragranular visual cortex of the rat. *Brain Res*, 279(1-2), 233-237. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90182-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(83)90182-8)
- Olavarria, J. F., Bock, A. S., Leigland, L. A., & Kroenke, C. D. (2012). Deafferentation-induced plasticity of visual callosal connections: predicting critical periods and analyzing cortical abnormalities using diffusion tensor imaging. *Neural Plast*, 2012, 250196. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/250196>
- Olavarria, J. F., & Safaeian, P. (2006). Development of callosal topography in visual cortex of normal and enucleated rats. *J Comp Neurol*, 496(4), 495-512. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20938>
- Osanai, Y., Shimizu, T., Mori, T., Yoshimura, Y., Hatanaka, N., Nambu, A., . . . Ikenaka, K. (2017). Rabies virus-mediated oligodendrocyte labeling reveals a single oligodendrocyte myelinates axons from distinct brain regions. *Glia*, 65(1), 93-105. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23076>
- Oztas, E. (2003). Neuronal tracing. *Neuroanatomy*, 2, 2-5.
- Pajevic, S., Basser, P. J., & Fields, R. D. (2014). Role of myelin plasticity in oscillations and synchrony of neuronal activity. *Neuroscience*, 276, 135-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.007>
- Palomero-Gallagher, N., & Zilles, K. (2019). Cortical layers: Cyto-, myelo-, receptor- and synaptic architecture in human cortical areas. *Neuroimage*, 197, 716-741. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.08.035>
- Partadiredja, G., Miller, R., & Oorschot, D. E. (2003). The number, size, and type of axons in rat subcortical white matter on left and right sides: a stereological, ultrastructural study. *J Neurocytol*, 32(9), 1165-1179. <http://dx.doi.org/10.1023/b:Neur.0000021910.65920.41>
- Pawley, J. (2006). *Handbook of biological confocal microscopy* (Vol. 236): Springer Science & Business Media.
- Peters, A., Payne, B. R., & Josephson, K. (1990). Transcallosal non-pyramidal cell projections from visual cortex in the cat. *J Comp Neurol*, 302(1), 124-142. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903020110>
- Peters, A., & Proskauer, C. C. (1980). Smooth or sparsely spined cells with myelinated axons in rat visual cortex. *Neuroscience*, 5(12), 2079-2092. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90126-8](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(80)90126-8)

- Purger, D., Gibson, E. M., & Monje, M. (2016). Myelin plasticity in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 110(Pt B), 563-573. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.001>
- Purves, R. (1980). Ionophoresis—progress and pitfalls. *Trends in Neurosciences*, 3(10), 245-247.
- Ralston, D. D., & Milroy, A. M. (1992). Inhibitory synaptic input to identified rubrospinal neurons in *Macaca fascicularis*: an electron microscopic study using a combined immuno-GABA-gold technique and the retrograde transport of WGA-HRP. *J Comp Neurol*, 320(1), 97-109. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903200107>
- Rausell, E., & Avendaño, C. (1985). Thalamocortical neurons projecting to superficial and to deep layers in parietal, frontal and prefrontal regions in the cat. *Brain Res*, 347(1), 159-165. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90905-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(85)90905-9)
- Redlich, M. J., & Lim, H. (2019). A Method to Measure Myeloarchitecture of the Murine Cerebral Cortex in vivo and ex vivo by Intrinsic Third-Harmonic Generation. *Front Neuroanat*, 13, 65. <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2019.00065>
- Roach, A., Takahashi, N., Pravtcheva, D., Ruddle, F., & Hood, L. (1985). Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell*, 42(1), 149-155. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80110-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80110-0)
- Roberts, R. C., & Ribak, C. E. (1987). An electron microscopic study of GABAergic neurons and terminals in the central nucleus of the inferior colliculus of the rat. *J Neurocytol*, 16(3), 333-345. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01611345>
- Rock, C., Zurita, H., Wilson, C., & Apicella, A. J. (2016). An inhibitory corticostriatal pathway. *Elife*, 5. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.15890>
- Rockland, K. S. (2019). What do we know about laminar connectivity? *Neuroimage*, 197, 772-784. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.07.032>
- Rockland, K. S., & Virga, A. (1989). Terminal arbors of individual "feedback" axons projecting from area V2 to V1 in the macaque monkey: a study using immunohistochemistry of anterogradely transported Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol*, 285(1), 54-72. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902850106>
- Rohkamm, R. (2014). *Color Atlas of Neurology* (G. O'Sullivan, Trad. 2e éd.). Allemagne : Thieme Publishers Stuttgart.
- Salami, M., Itami, C., Tsumoto, T., & Kimura, F. (2003). Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus

- and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6174-6179. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0937380100>
- Salzer, J. L., & Zalc, B. (2016). Myelination. *Curr Biol*, 26(20), R971-R975. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.074>
- Sanides, F. (1969). Comparative architectonics of the neocortex of mammals and their evolutionary interpretation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 167(1), 404-423.
- Sawchenko, P., Cunningham Jr, E., Mortrud, M., Pfeiffer, S., & Gerfen, C. (1990). Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde axonal transport technique *Methods in neurosciences : Quantitative and Qualitative Microscopy* (Vol. 3, pp. 247-260): Elsevier.
- Schuz, A., & Braitenberg, V. (2002). The human cortical white matter: Quantitative aspects of cortico-cortical long-range connectivity. . Dans A. Schuz & R. Miller (Éds.), *Cortical Areas: Unity and Diversity Conceptual Advances in Brain Research*. (pp. 377–385). London : Taylor & Francis.
- Seidl, A. H. (2014). Regulation of conduction time along axons. *Neuroscience*, 276, 126-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.047>
- Seress, L., Gulyás, A. I., Ferrer, I., Tunon, T., Soriano, E., & Freund, T. F. (1993). Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 337(2), 208-230. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903370204>
- Smith, R. S., & Koles, Z. J. (1970). Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am J Physiol*, 219(5), 1256-1258. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.219.5.1256>
- Snaidero, N., & Simons, M. (2017). The logistics of myelin biogenesis in the central nervous system. *Glia*, 65(7), 1021-1031. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23116>
- Stedehouder, J., Brizee, D., Slotman, J. A., Pascual-Garcia, M., Leyrer, M. L., Bouwen, B. L., . . . Kushner, S. A. (2019). Local axonal morphology guides the topography of interneuron myelination in mouse and human neocortex. *Elife*, 8. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.48615>
- Stedehouder, J., Couey, J. J., Brizee, D., Hosseini, B., Slotman, J. A., Dirven, C. M. F., . . . Kushner, S. A. (2017). Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. *Cereb Cortex*, 27(10), 5001-5013. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhx203>

- Stedehouder, J., & Kushner, S. A. (2017). Myelination of parvalbumin interneurons: a parsimonious locus of pathophysiological convergence in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 22(1), 4-12. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.147>
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., & Fields, R. D. (2002). Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*, 36(5), 855-868. [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01067-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01067-x)
- Sturrock, R. R. (1980). Myelination of the mouse corpus callosum. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 6(6), 415-420.
- Takasu, N., Nakatani, T., Arikuni, T., & Kimura, H. (1987). Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid in the hypoglossal nucleus of the macaque monkey, *Macaca fuscata*: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 263(1), 42-53. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902630104>
- Tamas, G., Buhl, E. H., & Somogyi, P. (1997). Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol*, 500 (Pt 3), 715-738. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022054>
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., . . . Salzer, J. L. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 47(5), 681-694. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.017>
- Thallmair, M., Metz, G. A., Z'Graggen, W. J., Raineteau, O., Kartje, G. L., & Schwab, M. E. (1998). Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*, 1(2), 124-131. <http://dx.doi.org/10.1038/373>
- Thomson, A. M., & Bannister, A. P. (2003). Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex*, 13(1), 5-14. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/13.1.5>
- Timmler, S., & Simons, M. (2019). Grey matter myelination. *Glia*, 67(11), 2063-2070. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23614>
- Tomassy, G. S., Berger, D. R., Chen, H. H., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Vercelli, A., . . . Arlotta, P. (2014). Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science*, 344(6181), 319-324. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1249766>
- Tomioka, R., Okamoto, K., Furuta, T., Fujiyama, F., Iwasato, T., Yanagawa, Y., . . . Tamamaki, N. (2005). Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci*, 21(6), 1587-1600. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03989.x>

- Tomioka, R., & Rockland, K. S. (2007). Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J Comp Neurol*, 505(5), 526-538. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21504>
- Tremblay, M. E., Riad, M., & Majewska, A. (2010). Preparation of mouse brain tissue for immunoelectron microscopy. *J Vis Exp*(41). <http://dx.doi.org/10.3791/2021>
- Turner, R. (2019). Myelin and Modeling: Bootstrapping Cortical Microcircuits. *Front Neural Circuits*, 13, 34. <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2019.00034>
- Wang, Q., & Burkhalter, A. (2007). Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol*, 502(3), 339-357. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21286>
- Wang, Q., Gao, E., & Burkhalter, A. (2011). Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J Neurosci*, 31(5), 1905-1918. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3488-10.2011>
- Wang, Q., Sporns, O., & Burkhalter, A. (2012). Network analysis of corticocortical connections reveals ventral and dorsal processing streams in mouse visual cortex. *J Neurosci*, 32(13), 4386-4399. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.6063-11.2012>
- Watakabe, A., & Hirokawa, J. (2018). Cortical networks of the mouse brain elaborate within the gray matter. *Brain Struct Funct*, 223(8), 3633-3652. <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-018-1710-5>
- Waxman, S. G., & Bennett, M. V. (1972). Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol*, 238(85), 217-219. <http://dx.doi.org/10.1038/newbio238217a0>
- Wen, Q., & Chklovskii, D. B. (2010). To myelinate or not to myelinate? Dans D. Feldmeyer & J. H. R. Lübke (Éds.), *New Aspects of Axonal Structure and Function* (pp. 103-113). New York: Springer.
- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H., Jr. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell*, 25(3), 319-323. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>
- Wouterlood, F. G., & Groenewegen, H. J. (1985). Neuroanatomical tracing by use of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L): electron microscopy of PHA-L-filled neuronal somata, dendrites, axons and axon terminals. *Brain Res*, 326(1), 188-191. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91402-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(85)91402-7)
- Wouterlood, F. G., Härtig, W., Brückner, G., & Witter, M. P. (1995). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the entorhinal cortex of the rat: localization, morphology, connectivity and ultrastructure. *J Neurocytol*, 24(2), 135-153. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01181556>

- Wouterlood, F. G., & Jorritsma-Byham, B. (1993). The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextran-amine: comparison with the tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin in preparations for electron microscopy. *J Neurosci Methods*, 48(1-2), 75-87. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270\(05\)80009-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270(05)80009-3)
- Yoshino, M., Saito, K., Kawasaki, K., Horiike, T., Shinmyo, Y., & Kawasaki, H. (2020). The origin and development of subcortical U-fibers in gyrencephalic ferrets. *Mol Brain*, 13(1), 37. <http://dx.doi.org/10.1186/s13041-020-00575-8>
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D., . . . Richardson, W. D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*, 77(5), 873-885. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>
- Zalc, B. (2016). The acquisition of myelin: An evolutionary perspective. *Brain Res*, 1641(Pt A), 4-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.005>
- Zhang, Y., Jiang, S., Xu, Z., Gong, H., Li, A., Luo, Q., . . . Chen, S. (2019). Pinpointing Morphology and Projection of Excitatory Neurons in Mouse Visual Cortex. *Front Neurosci*, 13, 912. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.00912>
- Zilles, K., Palomero-Gallagher, N., Gräßel, D., Schlömer, P., Cremer, M., Woods, R., . . . Axer, M. (2016). High-resolution fiber and fiber tract imaging using polarized light microscopy in the human, monkey, rat, and mouse brain *Axons and Brain Architecture* (pp. 369-389): Elsevier.