

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Biophysique

École doctorale Physique de la Région Parisienne (Paris)

Présentée par

Thomas PANIER

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Imagerie par nappe laser de l'activité neuronale dans l'ensemble
du cerveau d'un poisson-zèbre**

Dirigée par :

Georges DEBRÉGEAS

soutenue le 20 janvier 2014

devant le jury composé de :

M. Jean-Marc AIMONETTI	Examineur
M. Emmanuel BEAUREPAIRE	Rapporteur
M. Laurent BOURDIEU	Rapporteur
M. Éric CLÉMENT	Examineur
M. Georges DEBRÉGEAS	Directeur de thèse

Remerciements

Dans le désordre :

Je remercie ma famille de m'avoir donné les moyens intellectuels et matériels qui m'ont permis de devenir docteur.

Je remercie l'École de la République pour toute cette longue formation.

Je remercie le Laboratoire Jean Perrin pour les conditions de travail exceptionnelles qu'il offre et tous ses membres pour leur accueil fraternel. Mention spéciale pour Jérôme, pour la quantité et la qualité de nos discussions scientifiques.

Je remercie Georges, pour être "le directeur de thèse le meilleur du monde".

Table des matières

1	Introduction à la thèse	5
2	Perception Tactile Chez l'Homme	7
2.1	Introduction	7
2.2	État de l'art	8
2.3	Montage expérimental	16
2.4	Mise en œuvre	18
2.5	Résultats et conclusion	20
3	Imagerie Fonctionnelle par Nappe Laser du Poisson-Zèbre	23
3.1	Introduction à la Neuroimagerie	23
3.1.1	Enregistrer l'activité des neurones et d'un cerveau	24
3.1.2	Imagerie calcique	25
3.1.3	Les outils optiques pour l'imagerie de fluorescence	27
3.1.4	Illuminer par un plan : la nappe laser	28
3.2	Choix du poisson-zèbre	32
3.2.1	Un organisme modèle pertinent pour l'imagerie par nappe laser	32
3.2.2	Le rapporteur calcique : GCaMP3	33
3.2.3	Perspectives	34
3.3	Montage Expérimental	36
3.3.1	Montage utilisé	36
3.3.2	Préparation de l'échantillon	40

3.3.3	Film sur un seul plan	44
3.3.4	Image d'un volume	45
3.3.5	Film sur plusieurs plans	47
3.3.6	Performances Optiques	51
3.3.7	Photo-blanchiment	55
3.3.8	Autres options	58
3.3.9	Lentille cylindrique	58
3.3.10	Faisceau scanné - nappe moins focalisée	60
3.3.11	Axicon	61
3.4	Extraction et traitement des signaux calciques	64
3.4.1	Segmentation automatique	64
3.4.2	Traitement des signaux	67
3.4.3	Analyse des corrélations et clusterisation	70
3.4.4	Analyses des clusters	72
3.5	Conclusion	81

Bibliographie	84
----------------------	-----------

Annexe : Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy	92
--	-----------

Chapitre 1

Introduction à la thèse

Le titre de ma thèse était à l'origine : l'étude de la transduction de l'information tactile, chez l'humain et chez le rat. On pourrait croire que le sujet a beaucoup dérivé, mais ce n'est pas le cas : la transduction est restée au centre de nos préoccupations.

La perception tactile est fascinante de précision : sa capacité à discriminer, à sentir des différences minimales entre deux surfaces a donné lieu à une abondante littérature, preuve de la richesse du domaine. Dans l'intention d'apporter notre pierre à l'édifice, le projet initial était une étude expérimentale de la chaîne de transmission de l'information tactile : depuis la surface à explorer, en passant par la déformation du palpeur¹, jusqu'au codage par le système nerveux.

Les compétences du physicien placent naturellement son intérêt au milieu de la chaîne : modéliser la déformation du palpeur et les contraintes au niveau des capteurs biologiques, en fonction des conditions d'exploration, pour permettre de dérouler la suite de l'explication.

Mais il y a aussi un travail d'ingénierie à faire pour contrôler le début de la chaîne : la détermination d'un cahier des charges, des composants et des degrés de liberté pour le montage de stimulation.

La fin de la chaîne propose aussi du travail au physicien : il peut participer au

1. Le palpeur étant la peau dans le cas des humains, et la vibrisse — la moustache — pour les rats.

développement des techniques qui permettent l'enregistrement de l'activité nerveuse, et travailler à la décrypter avec les biologistes.

C'est en oscillant entre ces trois postes que j'ai construit ma thèse au cours du temps. C'est ainsi que le rat a fini par laisser sa place au poisson-zèbre, pour qui la perception des flux hydrodynamiques « remplace » la perception tactile. Et c'est ainsi qu'après trois ans, il a bien fallu changer de titre.

Chapitre 2

Perception Tactile Chez l'Homme

2.1 Introduction

La première partie de ma thèse devait prolonger et approfondir les travaux effectués précédemment au laboratoire Jean Perrin sur la perception tactile chez l'homme. Un montage bio-mimétique permettant la mesure des contraintes mécaniques à l'intérieur d'un doigt artificiel avait été utilisé pour montrer l'importance des empreintes digitales et de leur orientation pour la perception des surfaces [1].

Dans le cadre d'une collaboration avec Jean-Marc Aimonetti et Edith Ribot-Ciscar, membres de l'équipe de Jean-Pierre Roll et neurobiologistes de la perception chez l'homme au Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives à Marseille, nous avons cherché à apporter aux expériences sur l'homme un contrôle des conditions de stimulation comparable à celui que l'on avait avec l'expérience biomimétique.

Les recherches sur la perception tactile découlent de l'observation des capacités tout à fait remarquables de la main humaine, notamment pour la discrimination de textures, mais surtout pour la manipulation dextre et la préhension. Pour un être humain, la possibilité de soulever et manipuler un objet inconnu, qu'il soit léger, lourd, dur, mou, glissant, cassant, tout en faisant le moins d'effort possible, voilà qui

est quotidien, banal. Ce sont pourtant des tâches d'une grande complexité en termes de capteurs, de traitements de leurs informations et de commandes motrices ; preuve en est la difficulté qu'ont les roboticiens à doter leurs machines de cette capacité. « Comment ça marche ? » est donc une question riche, à même de susciter l'intérêt scientifique du chercheur. Y répondre pourra rapprocher les ingénieurs d'une solution pour créer des machines plus efficaces. En particulier, des progrès seraient bienvenus pour les prothèses à destination des personnes n'ayant pas — ou plus — toutes leurs capacités tactiles.

À la base de la chaîne perceptive se trouvent les mécanorécepteurs, des transducteurs biologiques situés dans la peau, qui informent le système nerveux central de l'état de déformation de cette dernière. Ils sont donc l'objet de notre étude.

2.2 État de l'art

La perception tactile, chez l'homme, repose essentiellement sur quatre types de mécanorécepteurs présents dans la peau en densité variable. Ces terminaisons nerveuses sont sensibles à différentes caractéristiques des contraintes mécaniques qui s'exercent sur elles. C'est-à-dire que selon la stimulation mécanique appliquée, les récepteurs émettent un signal neuronal qui permet au système nerveux central de générer la « sensation » correspondante.

Le signal neuronal se propage électriquement le long d'un neurone par une dépolarisation de la membrane, faisant passer transitoirement la différence de potentiel entre les milieux intra- et extra-cellulaire de $-70mV$ à $+30mV$. C'est cette variation rapide et stéréotypée du potentiel de membrane que l'on nomme le potentiel d'action (figure 2.1).

C'est au 19^e siècle que les anatomistes découvrent les terminaisons nerveuses et les corpuscules que nous regroupons maintenant sous le terme mécanorécepteurs, auxquels on donna d'abord le nom de leur découvreur : corpuscules de Pacini (1840),

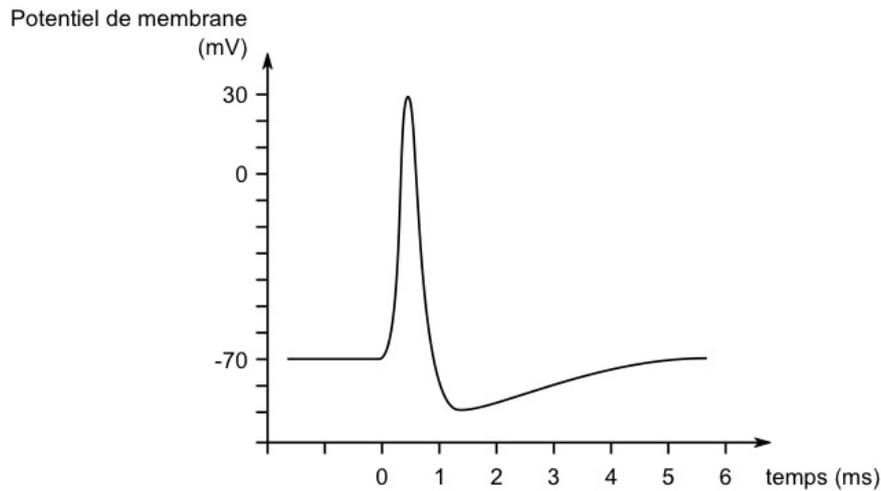


FIGURE 2.1 – Forme typique d'un potentiel d'action.

corpuscules de Meissner (1852), cellules de Merkel (1875) et corpuscules de Ruffini (1892). Les corpuscules de Pacini et de Ruffini se rencontrent en des densités semblables, autour de 15 unités par cm^2 en moyenne dans la main. Les cellules de Merkel et les corpuscules de Meissner sont les plus nombreux avec jusqu'à 75 et 140 unités par cm^2 , respectivement, au bout des doigts [2]. On retrouve les récepteurs de Pacini, de Meissner et de Merkel chez tous les vertébrés, et en particulier chez le singe, chez qui l'on s'autorise des expériences plus invasives que chez l'homme.

L'étude électrophysiologique de ces récepteurs à partir du milieu du 20^e siècle aboutit à une nomenclature plus fonctionnelle, selon que leur adaptation est lente ou rapide et que leur zone de sensibilité est réduite ou étendue. Un récepteur est dit à adaptation lente lorsqu'il répond de manière continue à un stimulus d'intensité constante. Il est alors nommé SA, pour *Slowly Adapting*. Au contraire, un récepteur à adaptation rapide reste silencieux lorsque soumis à un stimulus constant, et ne répond qu'aux variations d'intensité. Il est nommé RA, pour *Rapidly Adapting* (ou FA, pour *Fast Adaptation*). Ensuite, on peut distinguer les récepteurs de type 1, dont la zone de sensibilité ne dépasse guère les 25 mm^2 , et les récepteurs de type 2, dont la surface sensible s'étend sur plusieurs cm^2 .

Ainsi, les corpuscules de Pacini sont dits RA2, pour être sensibles aux vibrations

appliquées sur d'assez grandes surfaces. Les corpuscules de Ruffini sont dits SA2, leur réponse reflète les contraintes d'étirement de la peau et sont sensibles à distance. Les cellules de Merkel sont dites SA1 car elles rendent compte de la pression appliquée sur une zone très restreinte. Enfin les corpuscules de Meissner sont dits RA1 car ils traduisent les variations de pression appliquées sur une région peu étendue.

Les liens entre la stimulation et les réponses des récepteurs sont donc depuis longtemps explorés par la communauté, au travers de stimulations statiques¹ (un objet est appuyé contre la peau) ou dynamiques (une surface présentant un certain relief défile au contact de la peau).

La stimulation statique la plus simple est ponctuelle : dans l'étude illustrée sur la figure 2.2, Johansson utilise une pointe cylindrique de 400 μm de diamètre qui se termine par un hémisphère pour appuyer plus ou moins fort en différents endroits tout autour du récepteur enregistré. Cela permet de tracer une carte du champ récepteur, c'est à dire les zones à l'intérieur desquelles un certain déplacement suffit à provoquer une décharge neuronale. Remarquons la complexité des cartes des récepteurs de type 1, proches de la surface de la peau : l'anatomie nous apprend que les RA1 et les SA1 se ramifient à leur extrémité, ce qui explique la présence de plusieurs îlots de sensibilité maximale sur la carte d'un récepteur unique. La stimulation ponctuelle est donc riche d'information, mais elle n'est pas vraiment physiologique, au sens où elle n'intervient guère lors de l'exploration tactile, volontaire, d'une surface par un sujet.

On se rapproche des conditions réelles de la perception tactile en pressant, sur la peau autour du récepteur étudié, une surface possédant un relief. C'est l'objet de l'étude de J.R. Phillips et K.O. Johnson [4] (figure 2.3), chez le singe, où les auteurs appliquent une sorte de code-barre en relief au dessus d'un SA1 pendant une seconde, puis le retirent et le décalent de 200 μm dans la direction perpendiculaire aux barres.

1. « statique » est utilisé abusivement : les phases d'approche et de retrait nécessitent bien sûr un mouvement, et elles font l'objet d'une attention particulière puisqu'elles excitent les récepteurs à adaptation rapide.

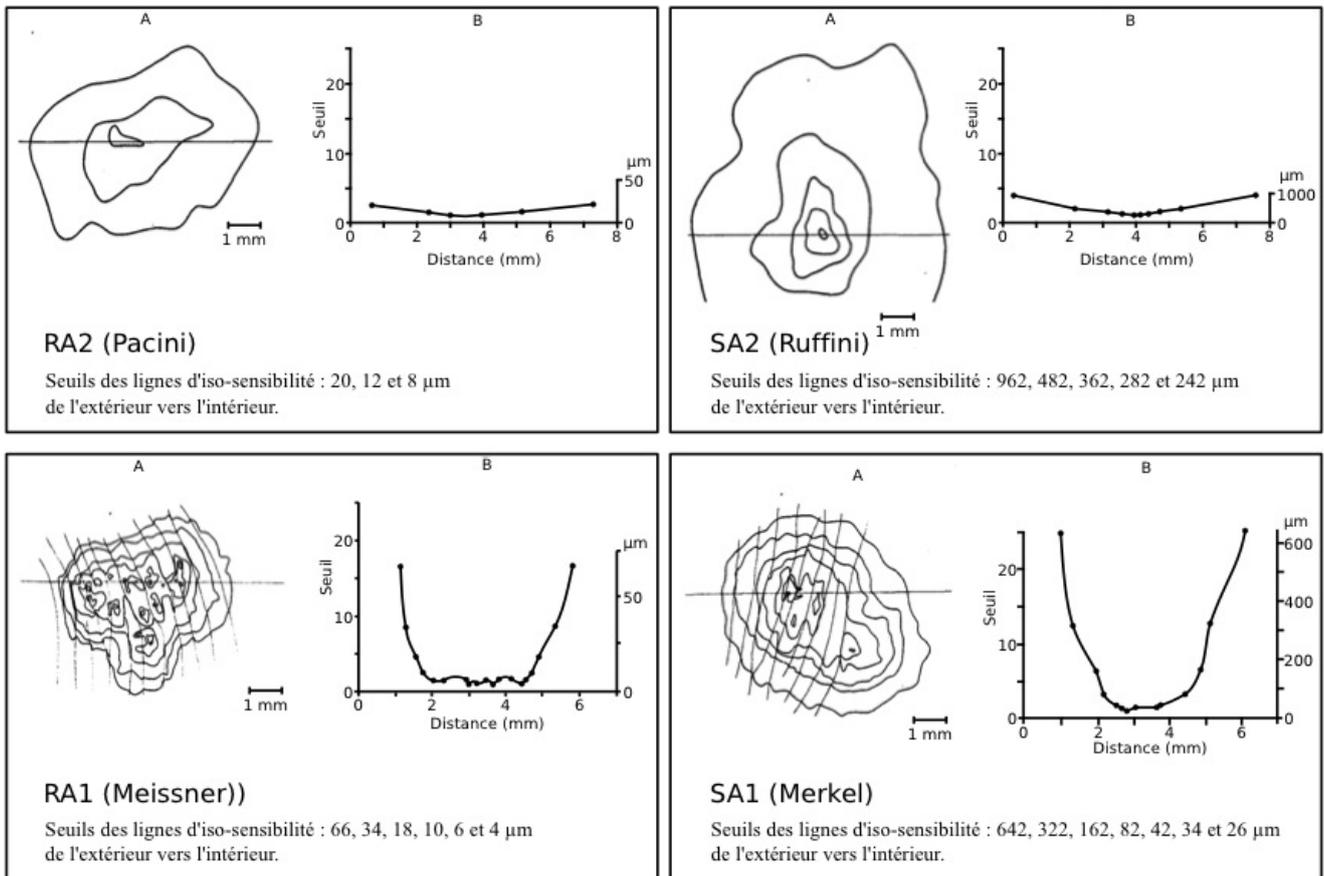


FIGURE 2.2 – Cartographie de la sensibilité à un stimulus ponctuel de quatre récepteurs. A : Les courbes fermées sont les lignes d'isosensibilité. Les lignes courbes ouvertes sont les creux des empreintes digitales (en bas). B : Profil de sensibilité le long de la ligne droite en A. Ordonnées de gauche : seuil de déclenchement en nombre de fois le seuil minimal du récepteur. Ordonnées de droite : amplitude du stimulus seuil. Abscisse : Distance depuis une origine arbitraire. Adapté de [3].

À chaque application, la fréquence de décharge de l'unité SA1 est mesurée. D'autre part, le champ de déformation dans la peau est évalué numériquement en fonction de la position des barres, et les auteurs montrent la proportionnalité entre la fréquence de décharge du neurone et l'excès de déformation au-delà d'un seuil. La sensibilité (coefficient de proportionnalité), le seuil et la profondeur du récepteur sont les seuls paramètres ajustés en utilisant un des enregistrements, et cela permet de retrouver les fréquences de décharge obtenues sur les autres enregistrements.

La caractérisation statique des mécano-récepteurs est donc bien faite depuis longtemps. Mais depuis plus longtemps encore on sait que c'est en frottant ses doigts

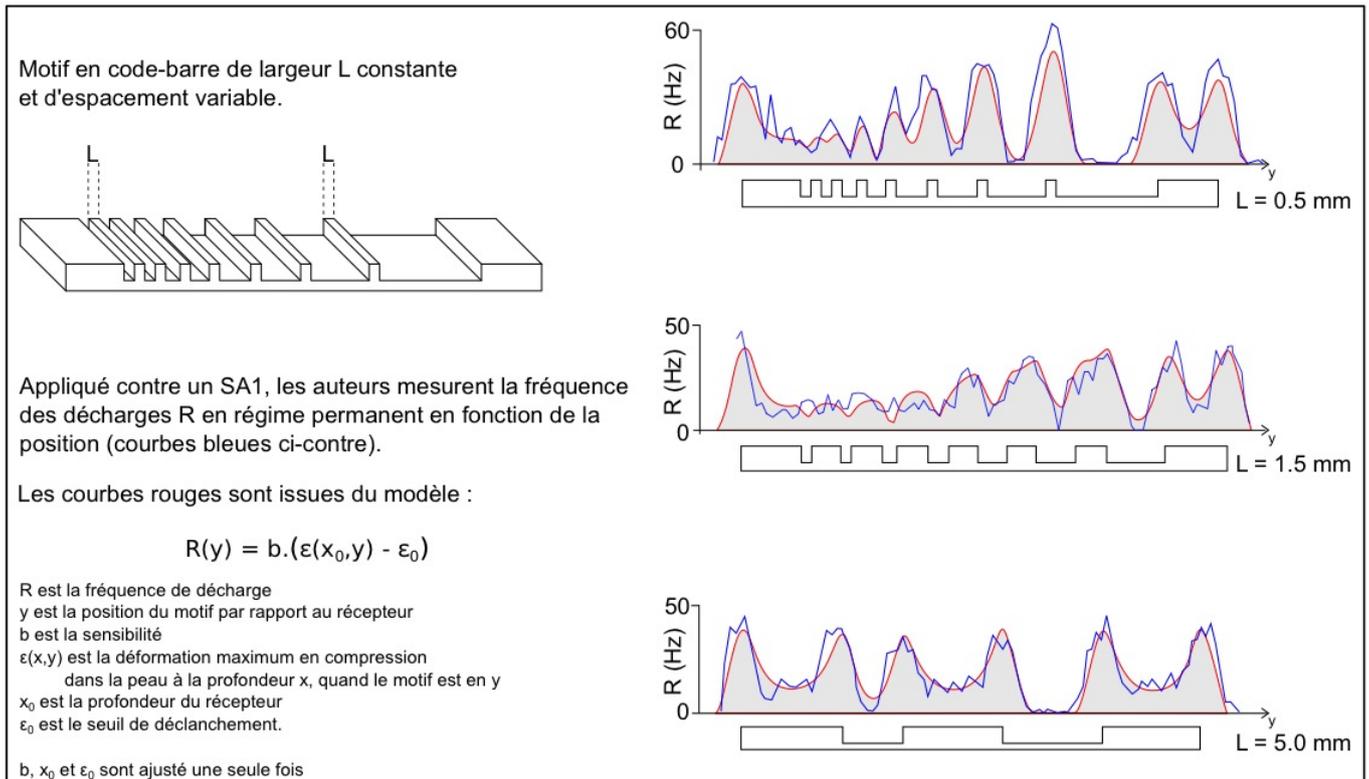


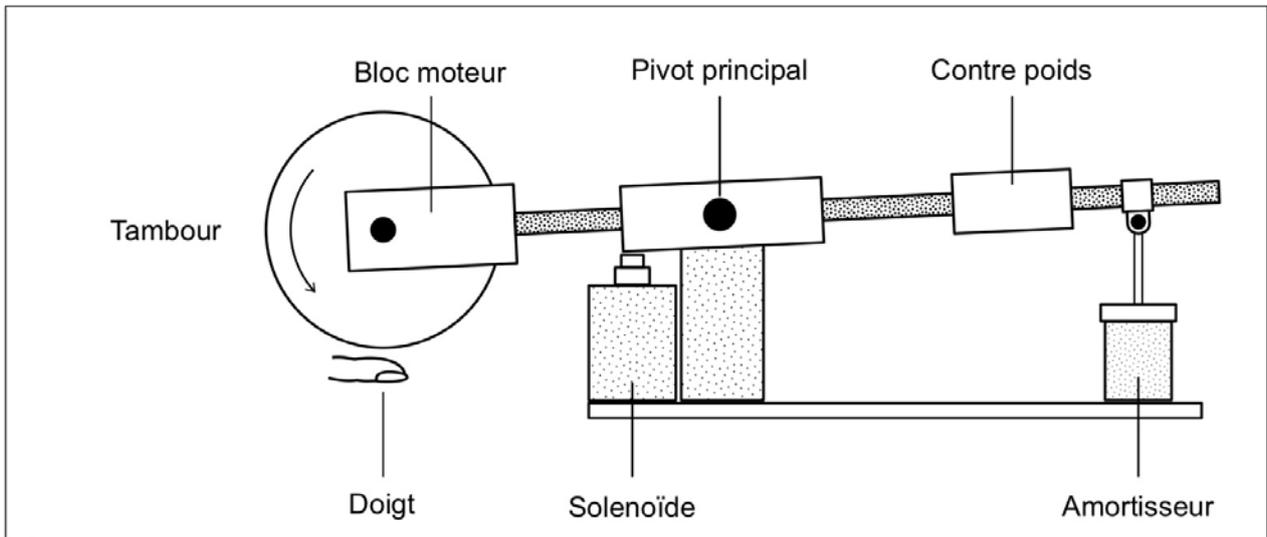
FIGURE 2.3 – Réponse d'un SA1 à l'application de reliefs en code-barres. Mesures et modèle. Adapté de [4].

contre l'objet d'intérêt que l'être humain en retire les informations les plus précises. David Katz écrivait dès 1925 que le mouvement est aussi indispensable à la perception tactile que la lumière l'est à la perception visuelle.

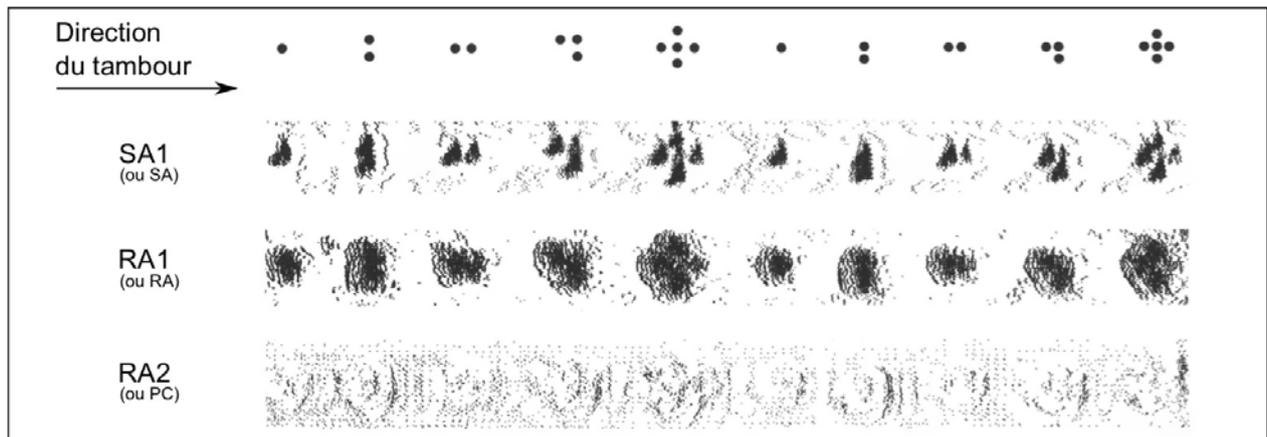
Ainsi, les expériences faisant intervenir des stimulations dynamiques ne sont pas en reste. Au premier chef : la stimulation ponctuelle. Kim et al. [5] utilisent une variation du moteur linéaire proposé par Chubbuck en 1966 pour générer, en vis-à-vis des mécano-récepteurs de la main du singe, des déformations contrôlées, fonctions arbitraires du temps. Une combinaison linéaire d'éléments purement cinétiques de ce signal, utilisée en entrée d'un modèle courant d' « intègre-et-tire », permet de prédire les instants de décharge avec une précision de l'ordre de la milliseconde. Ce résultat est donc probant, cependant il concerne encore une fois une stimulation détachée de toute réalité biologique. De plus, le modèle est *ad hoc* en ce qu'il fait l'impasse sur les propriétés mécaniques de la peau.

Pour ce qui est de la pertinence biologique de la stimulation, les travaux de K.O. Johnson des années 1980 aux années 2000 sont plus convaincants : ils sont centrés autour d'un dispositif de stimulation par un cylindre rotatif dont la surface circulaire présente un relief choisi par l'expérimentateur, appliqué sur la peau du sujet. Cela recrée donc la situation où le sujet sonderait la surface du cylindre en y faisant frotter son doigt. En 1981, Johnson étudie la résolution spatiale des mécano-récepteurs de la main du singe via des caractères Braille [6]. Il présente ses résultats sous la forme de « spatial event plots » (figure 2.4), ce qui permet de mettre en image la réponse d'un récepteur individuel et de la comparer à celle du stimulus.

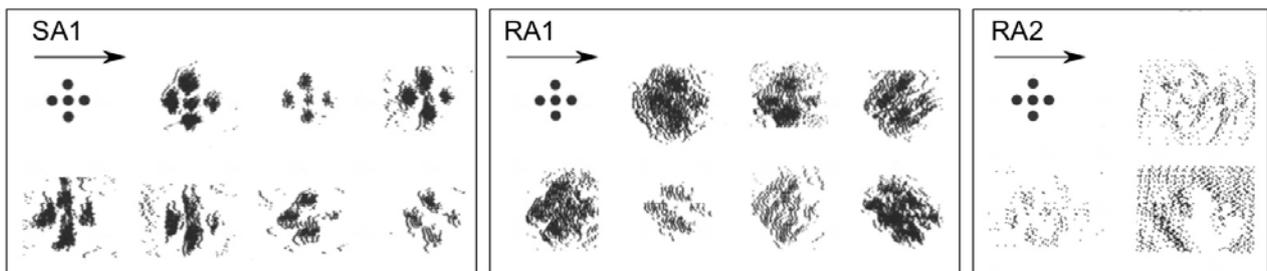
En 1990, le système est utilisé pour relier la sensation de rugosité aux réponses des récepteurs, via des plots régulièrement espacés, selon des périodes spatiales variables. En 1998, ce ne sont plus les neurones récepteurs qui sont enregistrés, mais des neurones du cortex somatosensoriel du singe — en aval dans la chaîne de traitement de l'information [7]. La surface est composée de plots de taille unique aléatoirement disposés sur la circonférence du cylindre, et un décalage du cylindre de $200 \mu\text{m}$ après chaque révolution génère un très grand nombre de stimulations différentes (figure 2.5). Ensuite un calcul de corrélation inverse permet de déterminer un champ récepteur dynamique qui fait apparaître des zones excitatrices et des zones inhibitrices. L'étude éveille la curiosité car elle utilise des neurones du cortex : la structure du champ récepteur vient-elle purement de la mécanique de la peau et de l'implantation des récepteurs ou résulte t'elle d'un traitement neuronal ? Pour répondre à cette question, il faut reprendre des enregistrements au plus près des récepteurs.



I



II



IIIa

IIIb

IIIc

FIGURE 2.4 – Réponse au défilement de caractères Braille. I : Montage expérimental. La force appliquée est réglée par le contre poids, le solénoïde autorise ou non le contact, et l'amortisseur évite les sautilllements. Le tambour est décalé de $125 \mu\text{m}$ parallèlement à l'axe de rotation après chaque tour. II : Motifs de stimulation et réponses de trois récepteurs types. Spatial Event Plot : un point est tracé pour chaque potentiel d'action, à l'endroit de la surface du cylindre qui surplombait le récepteur au moment de la décharge. III Réponses de plusieurs unités d'un même type. Adapté de [6].

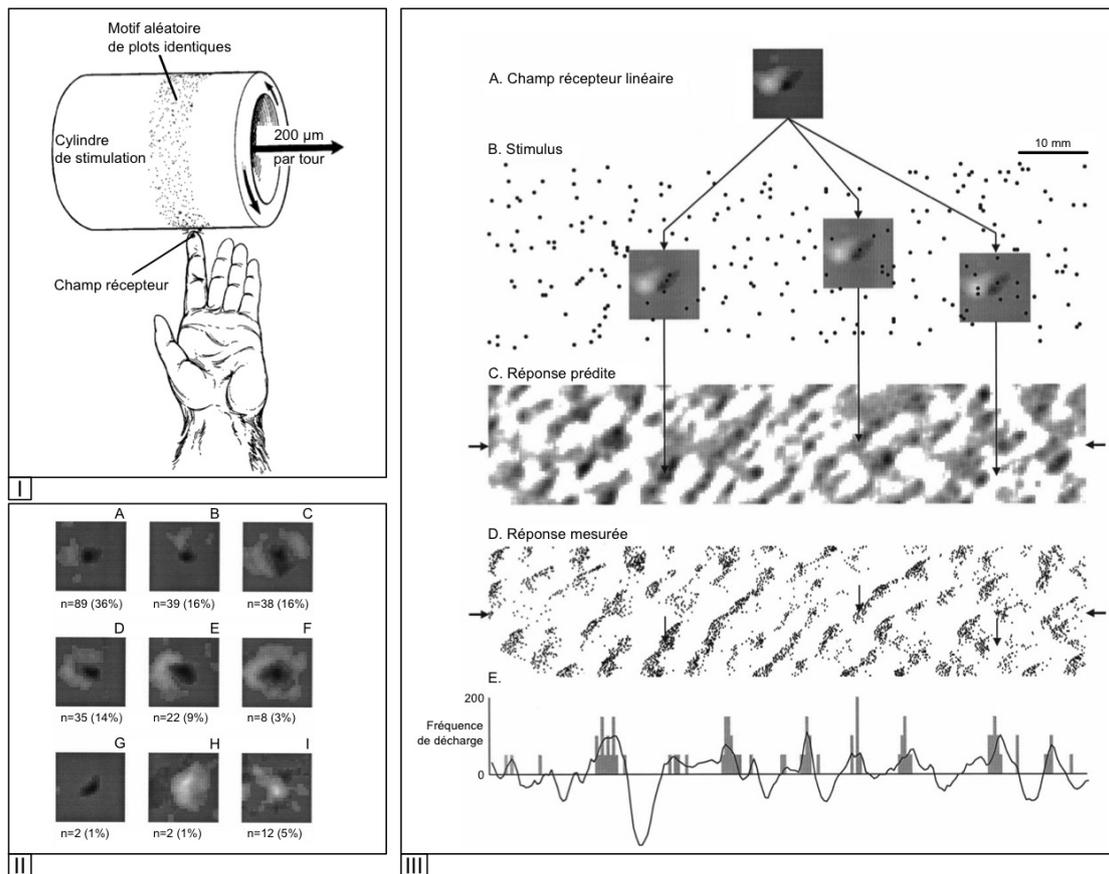


FIGURE 2.5 – Champs récepteurs associés à des neurones de l'aire 3b du cortex sensoriel du singe. I : Principe du montage. II : Catégorisation et fréquences associées des champs récepteurs relevés. Échelle de gris : noir (zone excitatrice), gris (zone indifférente), blanc (zone inhibitrice). La catégorisation se fait selon le nombre et la position des zones inhibitrices. III : Comparaison modèle - mesures. A : un champ récepteur obtenu par corrélation inverse, B : Convolution du stimulus et du champ récepteur, C : Réponse prédite par la convolution, D : Réponse mesurée, E : Profils le long de l'horizontale qui joint les flèches (courbe : modèle, histogramme : mesures). Adapté de [7].

Étant donné cet état de l'art, et à la suite des travaux du laboratoire Jean Perrin sur l'influence des empreintes digitales dans un système bio-mimétique, il était naturel de s'orienter vers les expériences de stimulation dynamique sur l'humain, en profitant d'un savoir-faire en mécanique du frottement, en élasticité et en micro-fabrication, dans le but de mieux cerner le fonctionnement des unités mécanoréceptrices, avant traitement par le système nerveux. L'objectif était de mettre en évidence la fonction caractérisant la transduction de l'information de topologie par le récepteur cutané, dans un contexte réaliste d'exploration.

2.3 Montage expérimental

Afin de déterminer les champs récepteurs dynamiques des mécano-récepteurs, ainsi que leur dépendance avec les conditions exploratoires (direction du frottement, vitesse, force appliquée), nous avons conçu un montage de stimulation (figure 2.6). Il reprend le principe du cylindre rotatif de Johnson et l'idée d'un motif de stimulation aléatoire en vue d'une corrélation inverse.

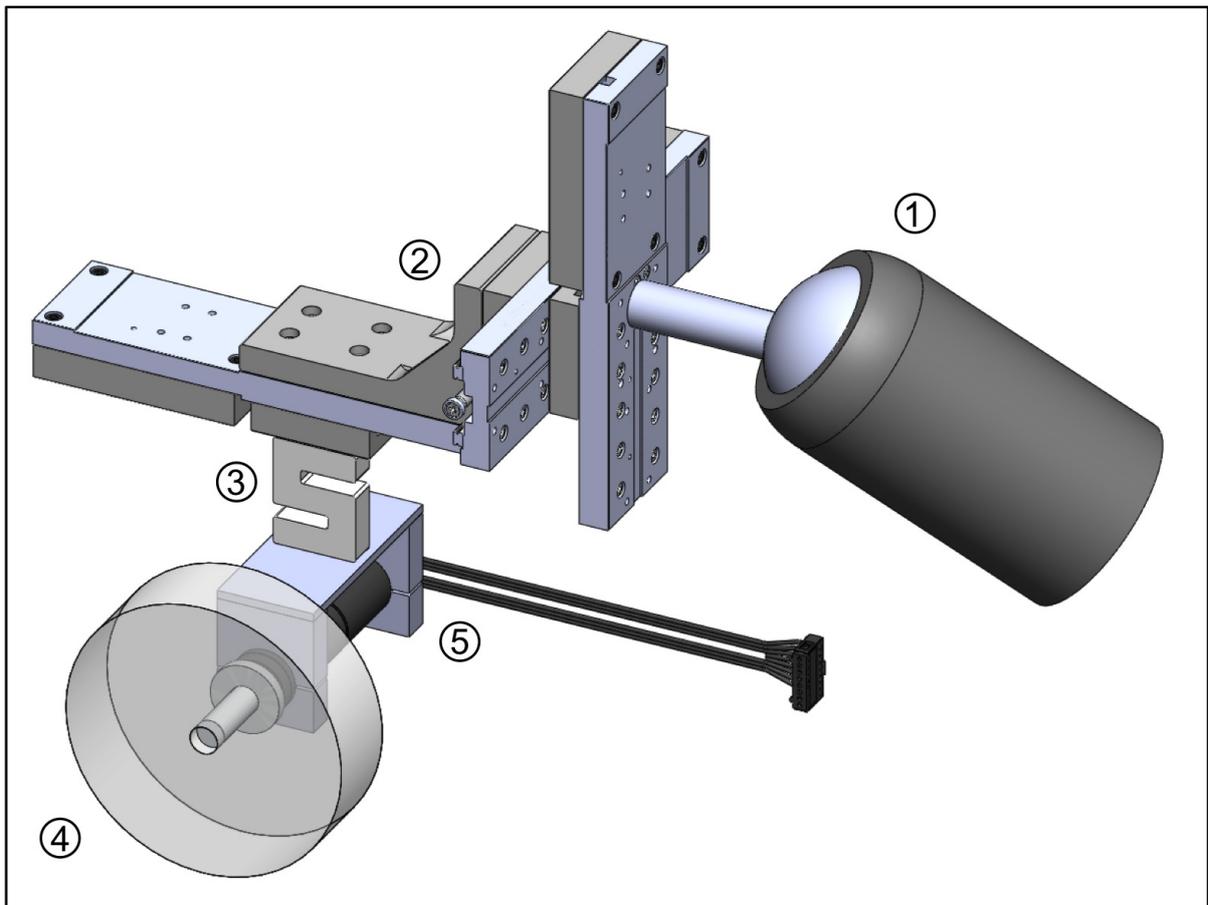


FIGURE 2.6 – Modélisation du dispositif, orienté pour frotter sur une surface horizontale. 1 : Rotule. 2 : Platines de translation XYZ. 3 : Capteur de force. 4 : Cylindre usiné. 5 : Moteur et roue codeuse.

Nous nous sommes donné le cahier des charges suivant : le dispositif devait pouvoir faire défiler un motif résistant, précis, de notre choix ; il devait permettre les mesures de la position du cylindre et de la force normale appliquée au cours du

temps ; et devait autoriser un positionnement angulaire quelconque et un contrôle précis de ses translations selon trois axes orthogonaux.

Pour répondre aux objectifs de solidité, de précision et de liberté dans le motif de la surface, les éléments de relief sont directement usinés sur un cylindre de 10 cm de diamètre en PMMA (équivalent du Plexiglas[®]) avec une microfraiseuse (Minitech Machinery Corporation). Cela permet de s'affranchir du problème de fixation de la texture sur le cylindre, qui ne manque pas d'arriver quand on utilise la méthode classique de photolithographie à plat pour créer les surfaces. D'autre part, cela n'empêche pas de créer de fins détails : le diamètre de la fraise la plus fine à notre disposition est de 25 μm , et la précision de la machine encore en dessous de cette valeur (5 μm). En sus, il est aisé de choisir la profondeur des passes de l'outil, donc de créer des reliefs de hauteur variable.

Le cylindre utilisé ici est gravé sur les trois quarts de sa circonférence par un motif de type code-barre : des tranchées sont usinées dans la direction axiale, et la distance entre deux fronts successifs (montant ou descendant) est aléatoire. Ainsi, à la fois la distance entre tranchées et la largeur des tranchées sont aléatoires. La profondeur des tranchées est fixée à un tiers de leur largeur, ce qui assure le non contact de la peau avec le fond de la tranchée.

La mesure de la position du cylindre est fournie directement par le moteur (Maxon ECmax 22L). Le choix pour ce dernier s'est porté sur un moteur électrique à courant continu, sans balais. Cette technologie permet un contrôle très fin de la vitesse de rotation, tout en minimisant les vibrations en fonctionnement. L'arbre moteur est équipé d'une roue codeuse de 2000 points par tour, et un réducteur à pignons planétaires de rapport 370 :1 permettant de coder un tour de cylindre sur 740 000 points. Soit une résolution théorique sur la position du relief de 0,4 μm pour un diamètre de 10 cm .

La force appliquée est mesurée par un capteur de force unidirectionnel (ME-Systeme KD40S), qu'il convient donc d'orienter dans la direction normale à la zone

de contact. La résolution avancée par le constructeur est de 50 mN.

Les possibilités d'orientation angulaire sont assurées par l'utilisation d'une rotule trois axes d'appareil photo (Bilora).

Quant aux translations, elles sont contrôlées par trois platines motorisées (Thorlabs MTS50/MZ8) de 50 mm de course, données pour une précision de 2 μm . Le contrôle motorisé et la précision sont mis à profit dans les trois directions : pour déplacer finement la zone de contact dans les directions parallèles à la peau, et pour définir la force appliquée dans la direction orthogonale.

L'ensemble est monté sur un support de binoculaire (Olympus STU1) pour l'approche, le retrait et les réglages de positionnement grossier. La grande masse et sa rigidité aident à limiter les vibrations malgré le porte-à-faux.

Une interface LabVIEW (National Instruments) unique réunit les éléments de contrôle et de mesure pour simplifier au maximum les réglages et la mise en œuvre du dispositif. Les expériences de micro-neurographie représentent déjà un protocole contraignant et des appareillages envahissants, donc soigner l'intégration de notre ajout était une vraie préoccupation.

2.4 Mise en œuvre

Une fois le montage assemblé et fonctionnel, il a été transporté dans les locaux de nos collaborateurs à Marseille, et ils ont pu commencer les enregistrements.

La micro-neurographie chez l'humain, telle qu'exposée par Vallbo et Hagbarth [16] s'effectue sur un sujet éveillé, avec une micro-électrode de tungstène de 250 μm de diamètre dans sa partie cylindrique et de 5 μm à l'extrémité de sa terminaison conique [17]. L'électrode est enfoncée dans le faisceau nerveux du pli du coude, dans le cas d'enregistrements sur le bras, ou du pli du genou dans le cas d'enregistrements sur la jambe [18]. La position du faisceau est d'abord grossièrement repérée par palpation, puis plus précisément par stimulation électrique — le sujet est alors appelé

à livrer ses sensations, ce qui guide l'expérimentateur.

L'électrode est alors insérée, à la main, vers le faisceau nerveux. La différence de potentiel entre la micro-électrode et une électrode de référence plaquée contre la peau est amplifiée puis tout à la fois visualisée sur un oscilloscope, enregistrée comme un signal audio sur une bande magnétique et diffusée via un haut-parleur. L'activité neuronale d'un grand nombre de fibres « écoutées » simultanément sonne comme un grésillement, mais selon la position de l'électrode dans le faisceau, elle peut être notablement plus sensible à une fibre en particulier. Comme la forme du potentiel d'action d'une fibre donnée est toujours la même, on entend alors une succession de sons caractéristiques (« poc ») au dessus du bruit. Si des « pac » se font aussi entendre, c'est qu'une autre fibre est particulièrement mise en avant par l'électrode.

L'expérience et la dextérité de l'expérimentateur sont alors mises à profit lors du déplacement minutieux de l'électrode, guidé par le son produit et les sensations du sujet, afin d'isoler le signal d'un récepteur unique. En même temps, une troisième personne stimule la peau avec un large pinceau pour créer un maximum d'activité dans le faisceau. Lorsqu'un signal est isolé, une caractérisation rapide est effectuée pour savoir s'il s'agit d'un récepteur musculaire ou cutané. S'il est musculaire, il ne convient pas pour notre étude. S'il est cutané et dans une zone accessible, il nous intéresse et il faut faire en sorte de pouvoir lâcher l'électrode sans perdre le signal, ce qui est délicat car elle est alors maintenue uniquement par la peau. Lorsque son signal est isolé et stabilisé, on étudie le récepteur : son type d'adaptation et sa zone de sensibilité pour déterminer si on a affaire à un RA1, SA1, RA2 ou SA2. On peut alors présenter le dispositif de stimulation.

La bande son qui représente l'activité du récepteur durant la stimulation est traitée après coup par un logiciel de tri des potentiels d'action (*spike sorting*). Ces logiciels sont prévus pour extraire d'un même enregistrement les instants de décharge de plusieurs cellules qui pourraient être écoutées, en tirant parti de l'extrême reproductibilité de la forme du potentiel d'action de chacune d'elles. Dans notre cas

il n'y a qu'une forme à reconnaître, et nous obtenons les instants des évènements avec une précision de 0,1 *ms*.

2.5 Résultats et conclusion

Dans ces expériences préliminaires, le dispositif est maintenu fixe pendant toute la durée des enregistrements : la position de la zone de contact ne change pas et le stimulus est périodique. Cela permet de mesurer la reproductibilité de la réponse du mécanorécepteur.

Le bas de la figure 2.7 résume la réponse d'un RA2 à 25 tours du cylindre. Chaque élément de la liste des instants des potentiels d'action détectés est représenté graphiquement par un point dont l'abscisse est l'instant modulo la durée d'un tour, et l'ordonnée est la partie entière de la division de l'instant par la durée d'un tour (le numéro de tour). On voit apparaître la régularité de la réponse du récepteur au motif. Le tracé du motif, à l'échelle horizontalement et dilaté verticalement, en regard du graphe des réponses montre qu'il n'y a pas un simple seuil sur la taille de la tranchée au delà duquel un potentiel d'action est émis. En général, sur cette unité, les grandes tranchées déclenchent une réponse, mais on en voit deux vers 80° qui laissent le récepteur muet et, au contraire, des fines vers 140° qui sont accompagnées de réponses. D'autre part, le médaillon montre qu'à l'intérieur des évènements, il y a une variabilité de l'ordre de 3 ms, soit 300 μm sur la position du relief.

La figure 2.8 montre la réponse d'un autre type de récepteur, un RA1, stimulé plus lentement à 4 tours par minute. La réponse est beaucoup plus irrégulière, même si une certaine structure se devine.

Le dispositif remplit donc son rôle, et c'est une bonne base de travail pour développer d'autres stimulations, notamment à base de plots. Mais ces figures font comprendre la nécessité d'un traitement statistique de longs et nombreux enregistrements. Malheureusement, le fait de travailler sur l'humain limite la fréquence à

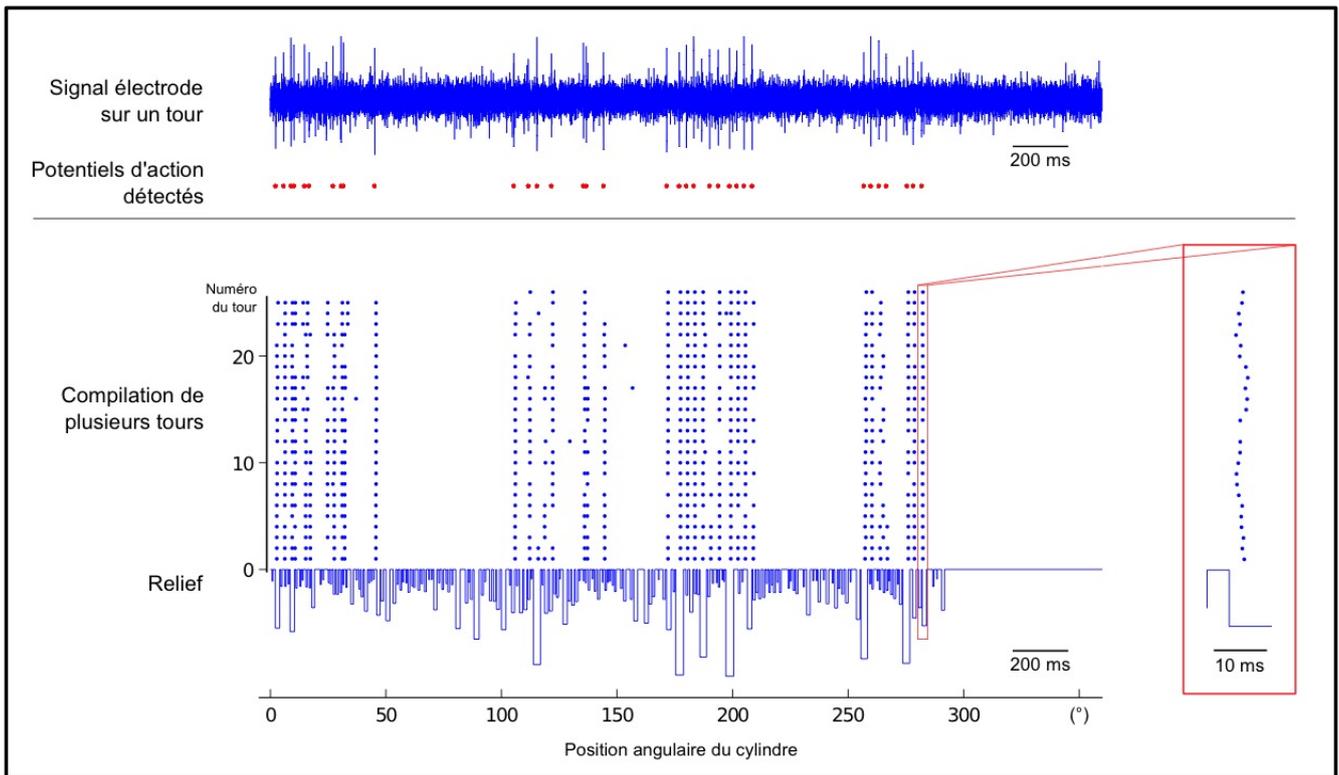


FIGURE 2.7 – Dépouillement de l’enregistrement d’un RA2 stimulé à 20 tours par minute. En haut : la trace brute sur un tour du signal de l’électrode (en bleu) et le résultat de la procédure de discrimination des potentiels d’action (en rouge). En bas : visualisation de l’ensemble des potentiels d’action détectés au cours de l’enregistrement, décalés en ordonnées selon le nombre de tours effectués par le cylindre, en regard du relief (profondeur exagérée). Médaille : variabilité du moment du déclenchement.

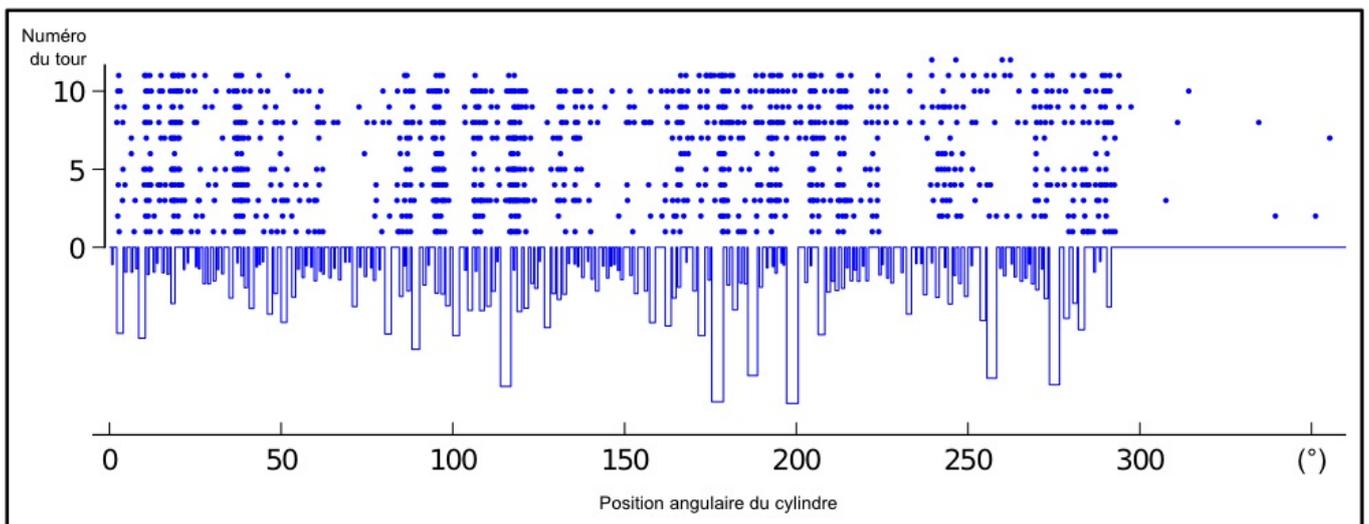


FIGURE 2.8 – Dépouillement de l’enregistrement d’un RA1 stimulé à 4 tours par minute.

laquelle on peut accumuler les données. Au contraire des expériences sur le singe, où une dissection permet d'isoler les fibres nerveuses d'intérêt, ici l'électrode est insérée en aveugle et il faut parfois plusieurs heures pour isoler et stabiliser le signal d'un récepteur, sans pouvoir choisir son type et sa localisation. Et il arrive que l'on « perde » le récepteur quelques minutes après. L'obligation d'immobilité finit par devenir pesante pour le sujet, et les séances ne peuvent pas s'éterniser. Enfin, les sujets humains sont des volontaires : ils ne sont pas « à disposition », ni en quantités illimitées, et parfois les manipulations ne se font pas, faute de sujet.

C'est cette contrainte forte sur le temps nécessaire pour accumuler des statistiques, incompatible avec la durée d'une thèse, qui a décidé de ma transition vers un autre projet. Un projet dont le montage pourrait être exploité dans notre laboratoire, sur un animal moins contraignant que l'humain, et pour lequel nous aurions la maîtrise de l'enregistrement de l'activité neuronale.

L'étude de la perception tactile et la collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives se poursuivent, portées par les membres permanents de l'équipe.

Chapitre 3

Imagerie Fonctionnelle par Nappe

Laser du Poisson-Zèbre

La seconde et majeure partie de mon travail de thèse a consisté en la mise au point d'un montage de microscopie par nappe laser appliqué à l'enregistrement de l'activité neuronale d'une fraction importante du cerveau d'une larve de poisson-zèbre.

3.1 Introduction à la Neuroimagerie

En première approche, on peut voir le cerveau comme un assemblage d'un très grand nombre d'éléments individuels, les neurones, qui échangent entre eux de l'information sous forme d'impulsions électriques. Du fonctionnement en réseau de ces constituants émerge toute la complexité et toutes les capacités de l'activité cérébrale. Ce réseau est particulièrement intriqué, chaque neurone pouvant être connecté à des milliers d'autres neurones ; il est aussi hiérarchisé, à partir du réseau local de quelques neurones, vers les aires spécialisées, jusqu'au cerveau tout entier [19].

Décrire et comprendre un tel réseau nécessite d'abord de relever un défi expérimental dont la difficulté provient de la diversité des échelles rencontrées [20]. Spatialement, les détails intracellulaires sont submicroniques alors que chez l'hu-

main par exemple, les distances entre zones du cerveau sont de l'ordre de 10 cm. Temporellement, l'échelle pour les potentiels d'action est la milliseconde alors que celle de phénomènes comme la mémoire dépasse la dizaine d'année.

3.1.1 Enregistrer l'activité des neurones et d'un cerveau

L'étude du fonctionnement du cerveau nécessite l'enregistrement de l'activité neuronale. La propagation du signal dans un neurone étant de nature électrique, on peut directement suivre l'activité de ce dernier à l'aide d'une électrode. Dans le cas des mesures in-vivo, l'électrode est insérée dans le milieu extra-cellulaire, selon une méthode rapportée pour la première fois en 1957 sur le système nerveux d'un chat [17].

Le grand atout des enregistrements électriques est leur échantillonnage à plusieurs kHz : il donne une excellente résolution temporelle sur l'instant de passage du potentiel d'action, il permet de résoudre chacun des potentiels d'action qui s'enchaînent rapidement lors d'une bouffée d'activité et il autorise la détection du détail de la forme des potentiels d'action.

Ce dernier point permet d'enregistrer plusieurs neurones avec la même électrode car la forme précise du potentiel d'action perçu par l'électrode est toujours la même pour une même cellule, mais change un peu d'une cellule à l'autre. Les logiciels de détection de potentiels d'action peuvent donc séparer les activités des différents neurones.

L'utilisation des électrodes a pourtant une faiblesse majeure : elle est invasive. Actuellement, une électrode peut, au mieux, enregistrer l'activité d'une centaine de neurones situés dans un rayon de 50 μm autour de son extrémité, donc il semble hors de portée d'enregistrer l'activité de tout le cerveau, voire même seulement d'une fraction significative, à l'aide d'électrodes. D'autre part l'électrode est insérée en aveugle, et l'on ne peut savoir précisément quels étaient les neurones enregistrés qu'avec une dissection après la manipulation.

Il existe d'autres techniques qui permettent l'enregistrement de l'activité dans tout le volume d'un cerveau, humain par exemple, la plus polyvalente aujourd'hui étant l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf). Il s'agit de mesurer les variations du flux sanguin et de l'oxygénation du sang comme signatures de l'activité. Cette méthode est lente (une image toutes les deux secondes) et très peu résolue spatialement (voxel millimétrique). En dépit de ces limitations, cette méthode est l'outil de prédilection des neurosciences expérimentales sur l'homme et a permis des avancées considérables dans la description du cerveau lorsqu'il est soumis à différentes situations, ou lors de l'exécution de tâches. L'autre caractéristique qui rend l'IRMf si pertinente est la possibilité de faire, avec le même appareil (IRM), une image simplement structurale du cerveau avant de s'intéresser à l'activité. Ainsi cette dernière peut ensuite être directement surposée sur l'anatomie du cerveau. Mais l'absence de résolution neuronale limite l'échelle de description à celle des zones cérébrales.

Entre ces deux techniques, situées aux extrémités du spectre des résolutions et qui obligent à choisir entre une bonne résolution spatio-temporelle et le suivi d'une fraction significative du cerveau, sont apparues ces vingt dernières années les méthodes optiques qui ont retenu notre intérêt. De fait, elles combinent les avantages fondamentaux des techniques précédentes : une résolution spatiale suffisante pour discriminer les neurones individuellement, et la possibilité de faire une image structurale pour associer les signaux à des positions dans le système.

3.1.2 Imagerie calcique

Les méthodes optiques de suivi de l'activité neuronale se basent sur la fluorescence de rapporteurs ajoutés dans les organismes, dont l'efficacité quantique dépend de certaines grandeurs qui varient lors d'un potentiel d'action.

Au nombre de ces grandeurs, on trouve naturellement le potentiel de membrane, mais aussi des concentrations ioniques : celles de Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , ces ions étant

échangés entre les milieux intra- et extra-cellulaire via des protéines transmembranaires lors des potentiels d'action.

Les rapporteurs dont la fluorescence est fonction du potentiel de membrane [22] ne sont pas encore assez efficaces pour être utilisés *in vivo*. Localisés sur la membrane, donc moins nombreux que des rapporteurs répartis en volume dans la cellule, et sensibles à un événement court (2 ms pour un potentiel d'action), ils ne sont pas assez brillants pour donner un signal qui sort du bruit [23]. Ceci étant dit, les résultats *in vitro* sont très encourageants [24].

Des rapporteurs qui seraient sensibles à la concentration en ions Na^+ ou K^+ ne donneraient *a priori* pas de signal exploitable, car ces ions sont déjà présents en grande quantité dans la cellule, et le passage d'un potentiel d'action modifie peu leur concentration.

Ces considérations expliquent le succès des rapporteurs calciques (sensibles à la concentration en calcium) pour le suivi de l'activité neuronale [25, 26]. D'une part le potentiel d'action fait entrer rapidement des ions Ca^{2+} , qui sont ensuite lentement pompés vers l'extérieur de la cellule (en quelques centaines de millisecondes), ce qui permet d'intégrer le signal pendant un temps d'exposition plus long. D'autre part, la concentration en calcium, qui vaut entre 50 et 100 nM dans la cellule au repos, est multipliée par un facteur compris entre 10 et 100 au passage d'un potentiel d'action [27]. Suivre la concentration en calcium permet ainsi d'obtenir de bons rapports signal sur bruit.

Il existe deux grandes familles de rapporteurs calciques : les rapporteurs synthétiques injectés par l'expérimentateur dans chaque spécimen, et les rapporteurs génétiquement encodés (*Genetically Encoded Calcium Indicator* : GECI), des protéines fluorescentes produites directement par les cellules d'intérêt du spécimen. La solution que nous avons retenue est présentée dans la suite, au paragraphe 3.2.2.

3.1.3 Les outils optiques pour l'imagerie de fluorescence

L'enregistrement optique par fluorescence de l'activité neuronale *in vivo* ne peut pas se faire avec un simple microscope à épifluorescence car cette technique est limitée aux échantillons minces. En effet, s'il essaie de faire une image de l'intérieur d'un échantillon en volume, un microscope classique récupère des photons venant du plan focal de l'objectif (qui correspondent à l'image recherchée) mais aussi des photons venant des régions hors-focus (avant et après le plan de mise au point) qui vont complètement « noyer » l'image recherchée.

Faire une image de l'intérieur d'un volume nécessite donc de supprimer les photons venant des régions hors-focus, en opérant un sectionnement optique de l'échantillon [33]. Le microscope confocal est l'outil le plus répandu qui permet cela : il bloque par un sténopé (*pinhole*, en anglais), conjugué du point focal objet de l'objectif, la plupart des photons qui ne proviennent pas dudit point focal (figure 3.1). Cela permet la mesure de la fluorescence en un seul point du spécimen, soit un pixel de l'image ; et il faut balayer ce point de mesure à l'intérieur du spécimen pour reconstituer l'image complète, pixel par pixel.

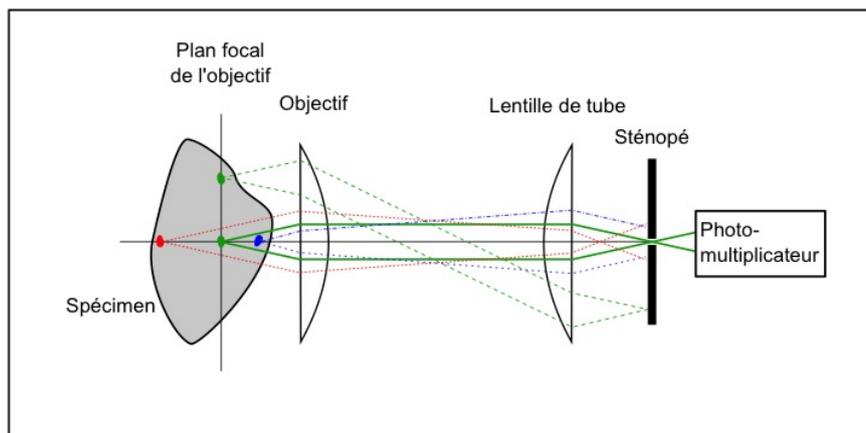


FIGURE 3.1 – Le sténopé bloque la plupart des photons qui ne proviennent pas du point focal de l'objectif. Adapté de [33]

Une autre façon de produire un sectionnement optique est de ne pas induire de fluorescence dans les régions hors-focus, auquel cas il n'y a plus de photons parasites

à éliminer. C'est ce principe qui est à l'œuvre par exemple dans les microscopes dit « 2 photons » [34], des appareils qui ont pris une importance capitale pour la recherche en biologie en général, et en imagerie calcique en particulier [35]. Ils utilisent un laser de longueur d'onde double de la longueur d'onde d'absorption, de sorte que deux photons, s'ils arrivent en même temps, apportent l'énergie nécessaire pour déclencher le processus de fluorescence. Selon ce mécanisme, l'émission de fluorescence est localement proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse du faisceau d'excitation. Il faut une grande densité de photons pour rendre probables ces événements et c'est le cas dans un petit volume autour du point focal de l'objectif, où le laser est focalisé. Comme pour le microscope confocal, ce point est balayé à l'intérieur du spécimen pour recréer l'image complète.

Cette particularité commune fait que les deux techniques souffrent d'une même limitation : le temps nécessaire à l'acquisition d'une image est proportionnel au nombre de pixels qui la composent. Toutes choses égales par ailleurs, augmenter la fréquence des prises de vue se fait alors au détriment de la taille de l'image, et inversement. Ceci est particulièrement dommageable dans le cadre de l'étude du cerveau car, on l'a dit, on cherche à suivre avec une bonne résolution temporelle l'activité de neurones qui sont répartis sur des zones étendues.

Bien que des améliorations techniques (comme la parallélisation de l'acquisition [36]) ou des raffinements dans la stratégie de mesure [37] (pour ne pas perdre de temps à imager des zones non-pertinentes) permettent de gagner en vitesse d'enregistrement tout en conservant l'approche du balayage point à point, un véritable bond des performances ne pourrait venir que d'un changement radical de la géométrie du microscope.

3.1.4 Illuminer par un plan : la nappe laser

L'illumination par nappe laser permet justement de passer de la situation où l'on éclaire et enregistre un seul point du plan focal de l'objectif, à une situation

où tout le plan focal est illuminé. Cependant, pour conserver la propriété de sectionnement optique il ne faut illuminer que le plan focal. Pour ce faire, l'échantillon est éclairé depuis le côté par une nappe laser (*lightsheet*, en anglais) alignée avec le plan focal de l'objectif d'observation (figure 3.2). Contrairement aux microscopes conventionnels pour la fluorescence, les trajets optiques d'excitation et d'observation sont complètement séparés.

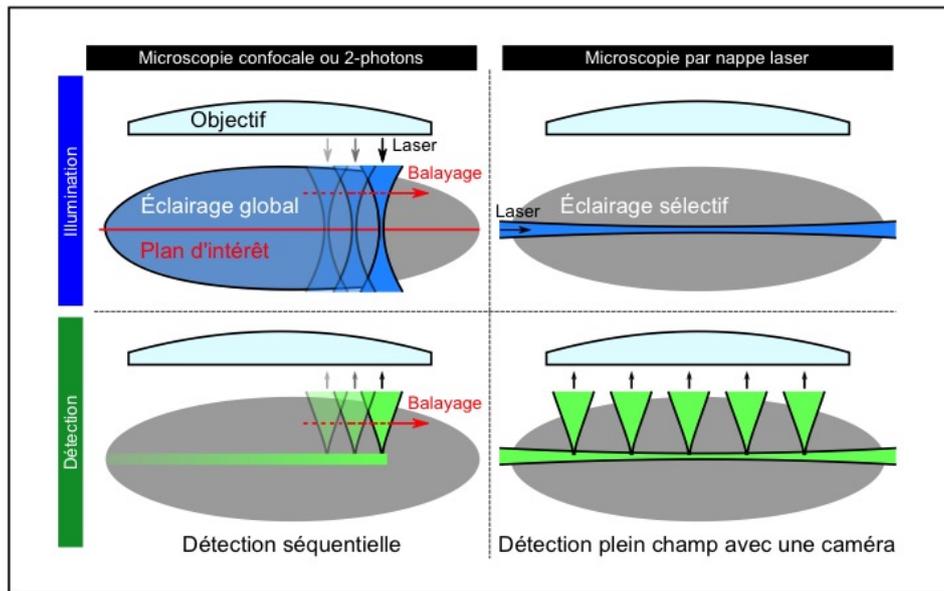


FIGURE 3.2 – Le microscope à balayage illumine l'échantillon en totalité et forme l'image point par point, alors que le microscope à nappe laser n'illumine que le plan d'intérêt et forme toute l'image en une seule fois.

Il est alors possible d'enregistrer l'image de tout le plan focal en même temps en utilisant une caméra. La taille du champ et la fréquence d'acquisition sont maintenant découplées : la taille du champ dépend de l'objectif d'observation et de la taille du capteur de la caméra ; et la fréquence d'acquisition dépend de la puissance lumineuse injectée et des performances de la caméra (rapidité, sensibilité, bruit), à sonde fluorescente donnée. Le développement récent d'objectifs de grossissement intermédiaire à grande ouverture numérique et des caméras sCMOS (*scientific CMOS*) à très grand capteur, grande cadence et haute sensibilité permet précisément de maximiser l'efficacité de cette géométrie et d'obtenir un haut débit de données.

En plus des gains en termes de performances de l'imagerie, la microscopie par nappe présente un avantage du point de vue de la biologie de l'échantillon. Avec les techniques point à point, où l'illumination et l'observation sont colinéaires, une grande partie de l'échantillon subit inutilement l'illumination. Dans le microscope par nappe laser, seule la zone imagée est illuminée, ce qui limite au maximum les effets de photo-toxicité et de photo-blanchiment, et permet d'envisager des enregistrements de longue durée. Par ailleurs, ces effets sont en général non-linéaires (ils varient plus rapidement que l'intensité), de sorte que pour une même illumination moyenne, une illumination plus continue est favorable : elle abaisse l'intensité instantanée maximale. Plutôt qu'éclairer le spécimen par un point, il vaut mieux l'éclairer par une ligne ou un plan.

Ce dernier point a été la motivation première pour le développement de l'imagerie par nappe laser, dans le but de suivre l'intégralité de l'embryogénèse chez la mouche *Drosophile*, puis chez le poisson-zèbre.

En 2004, Huisken *et al.* [39] montrent que leur microscope à nappe laser permet de visualiser tous les muscles d'une larve de poisson Medaka de quatre jours, fixée, dont les cellules musculaires expriment la protéine fluorescente verte GFP. La résolution annoncée est de $6 \mu\text{m}$, et le champ de vision fait $1,5 \times 0,9 \text{ mm}$. Le dispositif est ensuite utilisé pour faire l'image du volume de l'embryon d'une *Drosophile* par 56 images prises toutes les 5 minutes pendant 17 heures, ce qui ne perturbe pas son développement.

En 2008, Keller *et al.* [40] prolongent ces travaux en mettant au point un montage donnant $1 \mu\text{m}$ de résolution et un champ de $700 \times 700 \mu\text{m}$. Ils l'appliquent au suivi du développement d'un embryon de poisson-zèbre dont toutes les cellules expriment la GFP. La résolution est alors suffisante pour résoudre les divisions cellulaires. Pour suivre les déplacements et les divisions de toutes les cellules, 400 images sont effectuées toutes les minutes dans le volume de l'embryon, pendant plus de 24 heures. Malgré la longueur de l'enregistrement, la fluorescence reste constante.

Le très haut débit de données a été mis à profit par Holekamp *et al.* en 2008 [41] pour l'enregistrement *ex-vivo* de l'activité des neurones d'un organe voméro-nasal excisé de souris. Pour garder l'échantillon posé à l'horizontale, il faut utiliser la géométrie indiquée à la figure 3.3 où les branches d'excitation et d'observation du microscope sont à ± 45 degrés de la verticale. Dans un champ de $700 \times 100 \mu\text{m}$, 88 neurones sont visibles et enregistrés à 200 images par seconde. L'utilisation du rapporteur injecté Oregon green BAPTA-1 permet de détecter des potentiels d'action uniques s'ils ne se succèdent pas à plus de 20 Hz.

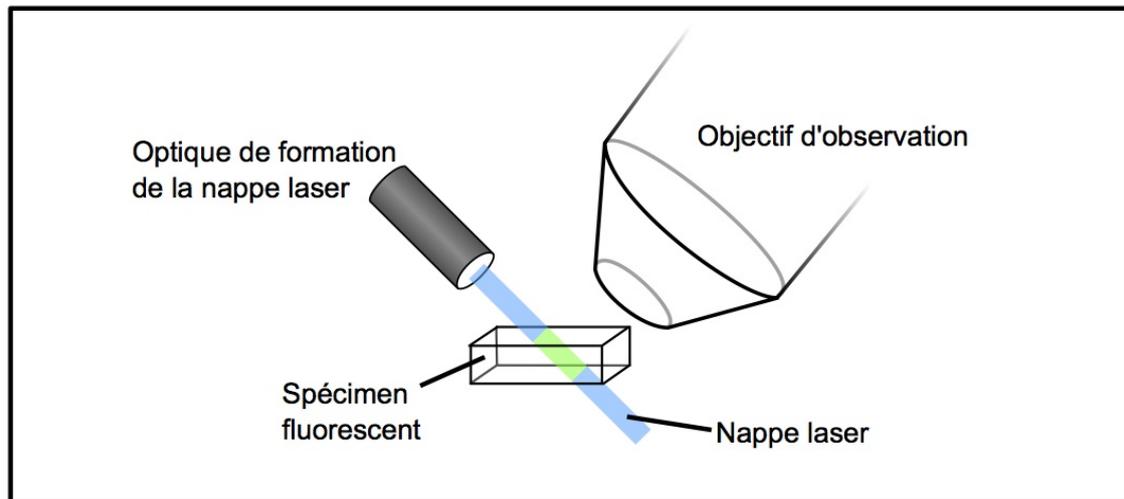


FIGURE 3.3 – Schéma du montage utilisé par Holekamp *et al.* Le microscope par nappe laser a besoin d'un large accès au spécimen. Adapté de [41]

Devant ces résultats, nous avons cherché à appliquer la technique de microscopie par nappe laser à l'imagerie calcique dans un autre vertébré, dont les dimensions et la transparence permettaient d'envisager des enregistrements *in vivo* de l'ensemble du cerveau.

3.2 Choix du poisson-zèbre

3.2.1 Un organisme modèle pertinent pour l'imagerie par nappe laser

Le poisson-zèbre est un organisme modèle pour la biologie, c'est-à-dire que son génome est maintenant complètement séquencé, et largement annoté. L'intérêt original pour cet animal concernait surtout le développement chez les vertébrés. En effet son développement, extra-utérin, est rapide : les organes principaux sont reconnaissables dès 24 heures post-fertilisation. D'autre part il est naturellement transparent jusqu'à l'état larvaire, hormis quelques pigments au niveau de la peau et des deux rétines, il se prête donc bien à l'imagerie structurelle, et maintenant à l'imagerie fonctionnelle [43, 44, 45].



FIGURE 3.4 – Un poisson-zèbre mâle adulte de 4 cm.

Aux cours de ces études, des milliers de mutants ont été développés et sont maintenant disponibles pour la communauté. En particulier, le type nacre ne synthétise aucun pigment ailleurs que dans la rétine. C'est ce type qui a servi de base pour le développement de la lignée dont nous nous sommes servis. À cinq jours post-fertilisation, la larve est alors presque totalement transparente et son cerveau est contenu dans un cylindre de 1 mm de long et 400 μm de diamètre. Cette géométrie compacte et allongée est très favorable à l'imagerie par nappe laser.

Au demeurant, le poisson-zèbre est un animal facile à maintenir, fertile à partir de trois mois, et chaque ponte peut produire plusieurs dizaines d'embryons.

3.2.2 Le rapporteur calcique : GCaMP3

Nous avons pu utiliser pour nos expériences des larves de poissons-zèbre de type Nacre génétiquement modifiés pour exprimer le rapporteur calcique GCaMP3. Cette lignée a été développée par l'équipe de German Sumbre de l'Institut de Biologie de l'ENS, à partir de fragments fournis par HC Park, de la *Kyungpook National University* en Corée, L. Looger, du *Howard Hughes Medical Institute*, à Ashburn aux États-Unis d'Amérique et K. Kawakami, du *National Institute of Genetics*, à Shizuoka au Japon.

L'expression de GCaMP3 est ici sous contrôle du promoteur HuC, qui est exprimé dans tous les neurones. C'est ainsi que l'on profite au mieux du plein champ du microscope, de façon reproductible, sans les aléas de l'injection locale de rapporteurs synthétiques.

Les rapporteurs de la famille GCaMP [46] sont construits autour d'une protéine fluorescente verte modifiée, cpEGFP, à laquelle sont attachés une protéine Calmoduline et un peptide synthétique M13 (figure 3.5). La cpEGFP fluoresce autour de 515 nm lorsqu'elle est excitée autour de 485 nm. Lorsque la Calmoduline est liée aux ions calcium, elle induit un changement de conformation dans le M13 qui se répercute en un changement de conformation de la cpEGFP et une augmentation de sa fluorescence. Une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} dans le neurone entraîne donc une augmentation de son signal de fluorescence.

Les performances du rapporteur calcique sont mesurées, d'une part, par la variation relative de son intensité de fluorescence ($\Delta F/F$) au passage des potentiels d'action, et d'autre part, par ses temps de montée et de descente. Les mesures pour GCaMP3 dans des cellules de souris ex-vivo donne des variations de fluorescence de 14 % au passage d'un potentiel d'action, et de 500 % si 40 potentiels d'actions se succèdent rapidement dans le neurone [47]. Le temps typique de montée de la fluorescence est de 100 ms, et de 650 ms pour la descente.

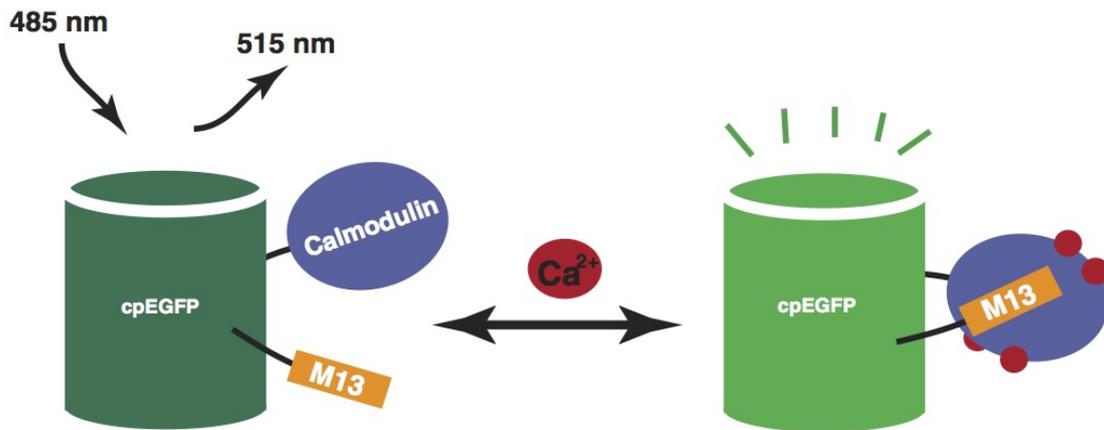


FIGURE 3.5 – (Schéma du fonctionnement des GCaMP. En se liant à la Calmoduline et au M13, l’ion calcium induit un changement de conformation dans la protéine fluorescente verte qui en voit sa fluorescence augmentée.

3.2.3 Perspectives

La multitude des travaux autour du poisson-zèbre permet d’envisager de nombreuses possibilités futures avec un montage qui lui est dédié. La connaissance des quelques comportements stéréotypés que la larve met en œuvre face à une proie, un prédateur ou certains stimuli bien caractérisés, ouvre la voie pour des études complètes de suivi du traitement neuronal de la chaîne : acquisition de l’information — traitement/décision — réponse motrice.

D’autre part, les améliorations du rapporteur calcique (GCaMP5) ont rapidement été portées au poisson-zèbre. Elles permettent d’envisager une meilleure détection de l’activité *in vivo*, via une meilleure efficacité quantique, donc un meilleur signal dans un environnement bruyant. Car alors même les activités de faible intensité, composées de peu de potentiels d’action, peuvent sortir du bruit. GCaMP6, encore plus performant [48], est en passe d’être disponible chez le poisson-zèbre.

Enfin, la transparence de la larve de poisson-zèbre en fait un sujet idéal pour l’optogénétique [49]. Dans ce domaine, les spécimens sont génétiquement modifiés pour que leurs neurones soient contrôlables par de la lumière. Les neurones ciblés par les modifications génétiques expriment des protéines transmembranaires sensibles à

certaines longueurs d'onde. En exposant un tel neurone à la bonne longueur d'onde, on peut le forcer à émettre des potentiels d'action, ou au contraire l'inhiber et l'empêcher d'en émettre.

3.3 Montage Expérimental

Voici le cœur de mon travail de thèse, l’aboutissement d’une longue suite d’essais, d’ajouts d’éléments au gré de recherches technologiques, de réglages, de retraits d’éléments tous comptes faits, d’assemblages et d’apprentissages, qui a fait passer d’une table rase à un montage qui donnait des images peu exploitables mais encourageantes, jusqu’à des images tout à fait enthousiasmantes.

3.3.1 Montage utilisé

Notre montage utilise comme source de lumière un laser Coherent Sapphire 488nm, dont la puissance est réglable de 20 à 200 mW. Après passage dans une densité optique (Thorlabs ND10A, densité optique : 1.0), le faisceau est envoyé sur un miroir galvanométrique (Century Sunny TSH8203) qui oscille sinusoidalement à 400 Hz autour d’un axe vertical, avec une amplitude de 9 degrés mécaniques. Immédiatement après le miroir se trouve un couple de lentilles convergentes (Thorlabs AC254-30-A et AC254-200-A, focales 30 et 200 mm, traitées antireflets) montées en système afocal servant d’agrandisseur de faisceau. Enfin, on place l’objectif d’illumination (Zeiss 5x, NA 0.16, EC Plan-Neofluar) qui focalise le faisceau dans l’échantillon.

La position relative des éléments est comme suit : le point focal objet de la première lentille – dite « lentille de scan » – est positionné sur le miroir, tandis que le plan focal image de la seconde lentille – dite « lentille de tube » – est mis en correspondance avec la pupille arrière de l’objectif d’illumination (figure 3.6). Cela assure que pour tous les angles de déviations engendrés par le miroir, l’intégralité du faisceau passe dans l’objectif d’illumination. En terme d’optique géométrique, un rayon provenant du miroir, donc du point focal objet de la lentille de scan, avec un angle par rapport à l’axe optique se retrouve parallèle à celui-ci après passage par la lentille, mais décalé. Ce décalage est retransformé en angle par la lentille de tube,

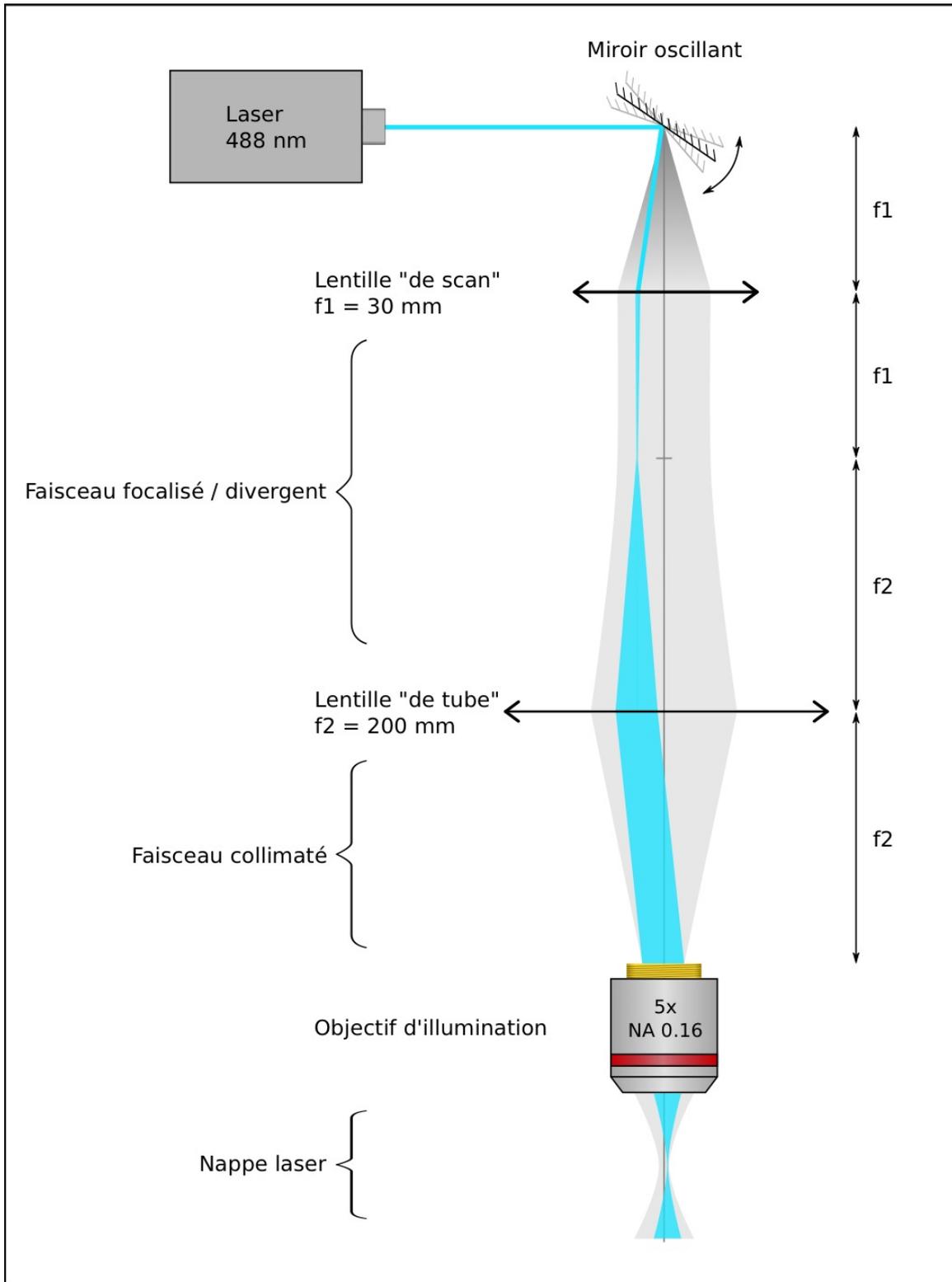


FIGURE 3.6 – Schéma vu de dessus de la branche d'illumination du microscope. Formation de la nappe laser.

et le rayon passe par le point focal image de cette dernière. Donc le rayon passe dans la pupille arrière de l'objectif et participe à la formation du faisceau focalisé. L'angle redevient un décalage au niveau de l'échantillon, et la variation rapide de l'angle crée un balayage et l'illumination en nappe recherchée. Avec les composants et l'amplitude angulaire précités, on obtient une nappe de 2 mm de largeur dans la direction du scan.

Le système afocal est nécessaire pour placer le point autour duquel le faisceau pivote sur la pupille arrière de l'objectif, où l'on ne peut pas physiquement placer le miroir. Il est ensuite commode d'utiliser ce système comme agrandisseur de faisceau car, à objectif d'illumination donné, c'est la largeur du faisceau d'entrée qui fixe complètement la géométrie du faisceau de sortie, donc l'épaisseur de la nappe et la distance sur laquelle cette épaisseur est quasi constante. Ce point est détaillé dans la suite – Performance Optique.

La branche d'observation du microscope (figure 3.7) est montée sur un mât vertical et se compose d'un objectif à immersion à eau, grande ouverture numérique et large champ (Olympus, 20x, NA 1.0, XLUM-PLFLN), d'un filtre interférentiel coupe-bande éliminant la longueur d'onde du laser (Thorlabs NF488-15), d'une lentille de tube de 150 mm de distance focale (Thorlabs AC254-150-A) et d'une caméra sCMOS rapide et sensible, à grand capteur (pco.edge). Trois platines micrométriques permettent le positionnement manuel de l'ensemble par rapport à l'échantillon, et un support piezo-électrique d'objectif (piezosystem jena MIPOS 500) permet la mise au point fine et le déplacement contrôlé de l'objectif.

La caméra est capable d'enregistrer à 100 Hz des images de 2560 x 2160 pixels en 16 bits, ce qui correspond à 1,1 Go/s. Elle est reliée en Dual-CameraLink à un ordinateur dont les huit disques durs de 2 To sont configurés en RAID0. Cette configuration autorise le système à écrire en parallèle sur les différents disques ; la vitesse d'écriture maximum est donc la vitesse d'écriture sur un disque multipliée par le nombre de disques. Ceci permet d'enregistrer directement les images sur les

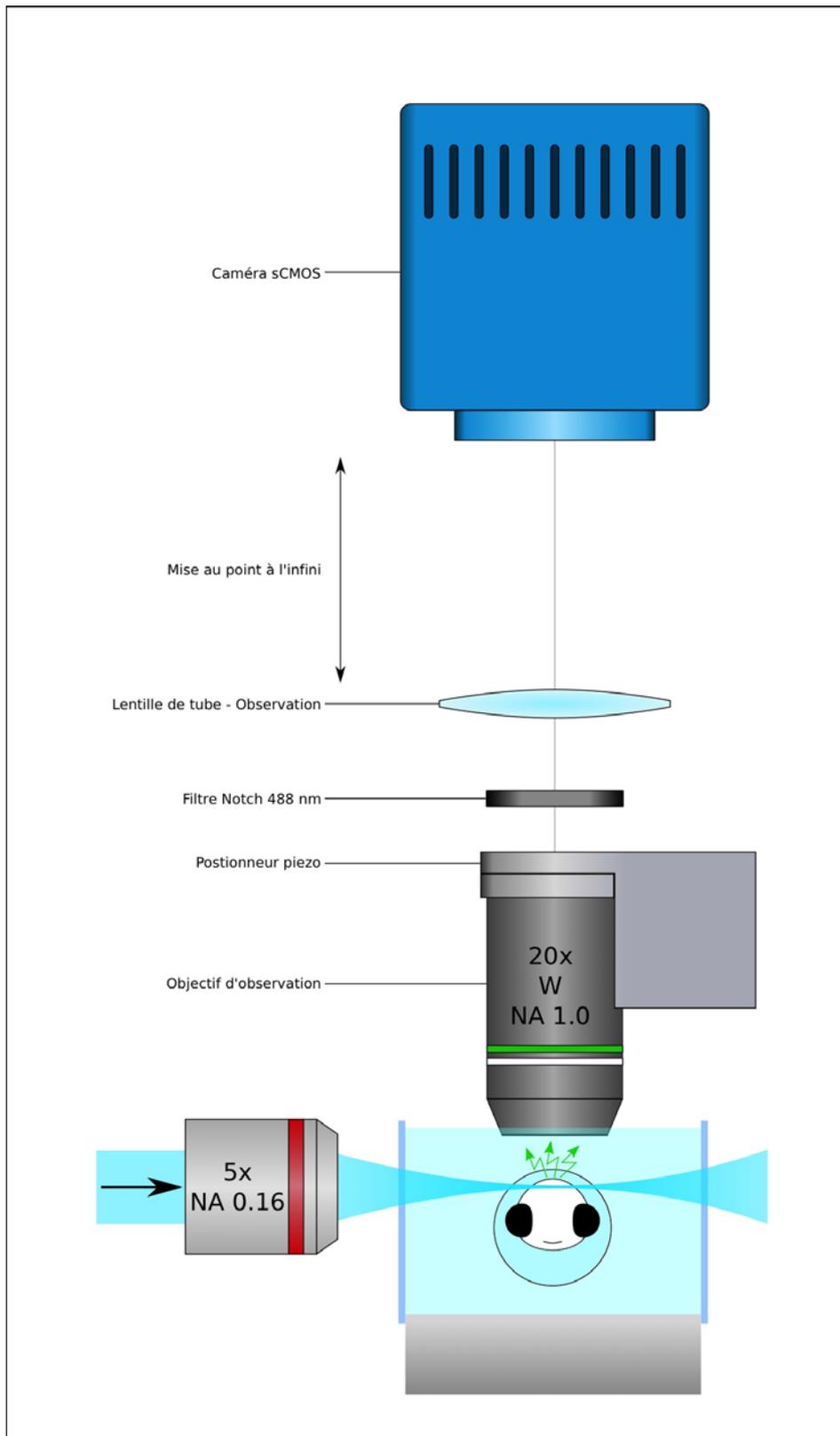


FIGURE 3.7 – Vue de côté de la branche d'observation du microscope.

disques durs, soit possiblement plus de 4 heures en continu, plein champ et pleine vitesse. En pratique, seule la zone d'intérêt est enregistrée, à des fréquences allant de 10 à 40 Hz, et typiquement une seconde de film occupe plutôt 100 Mo.

Le mouvement du miroir, les déplacements piezoélectriques et, dans certains cas, le déclenchement et l'exposition de la caméra sont contrôlés par l'ordinateur, via une interface unique développée sous LabVIEW de National Instruments. Lorsque la caméra est opérée séparément, elle l'est via le logiciel CamWare fourni par son fabricant.

3.3.2 Préparation de l'échantillon

L'échantillon est une larve de poisson zèbre de 5 à 8 jours, naturellement transparente à cet âge. De plus, étant issue de la lignée Nacre, la larve exprime beaucoup moins de pigments colorés que ses congénères de type sauvage.

Pour permettre la prise d'image, la larve est paralysée et immobilisée dans de l'embryo medium – le liquide physiologique qui convient à son développement – gélifié par de l'agarose à basse température de transition. 50 mL de cette solution sont préparés à l'avance avec de l'embryo medium, 1,8 % en masse d'agarose (Sigma A9414) et 0,3 mg/mL de paralysant (Pancuronium Bromide, Sigma P1918), pour être stockés à -4°C en doses individuelles de 0,5 mL. Pour chaque échantillon, une de ces doses est mise à liquéfier au micro-onde, puis disposée dans un support thermostaté à 37°C. Cette température est au-dessus de la température de transition vers le gel de l'agarose, et compatible avec la survie de la larve pour une brève exposition. Lorsque la dose individuelle est à température, on y introduit la larve avec une pipette, en minimisant l'eau ajoutée.

Après avoir laissé la larve 5 minutes dans le mélange (gardé à température) pour laisser agir le paralysant, on l'extrait à l'aide d'une mini-seringue de notre fabrication. Le corps de la seringue est un capillaire cylindrique de 1,50 mm de diamètre interne. Un tube de plastique de diamètre légèrement inférieur coulisse

à l'intérieur et agit comme un piston. Quand le poisson et son entourage d'agar liquéfié sont aspirés, la seringue est laissée à l'air libre le temps que l'agar solidifie. Il est alors possible de pousser sur le piston pour faire légèrement sortir la partie du boudin d'agar qui contient la larve, qui protrude tout en restant solidaire du capillaire. Cette mini-seringue est l'élément central du porte échantillon (figure 3.8).

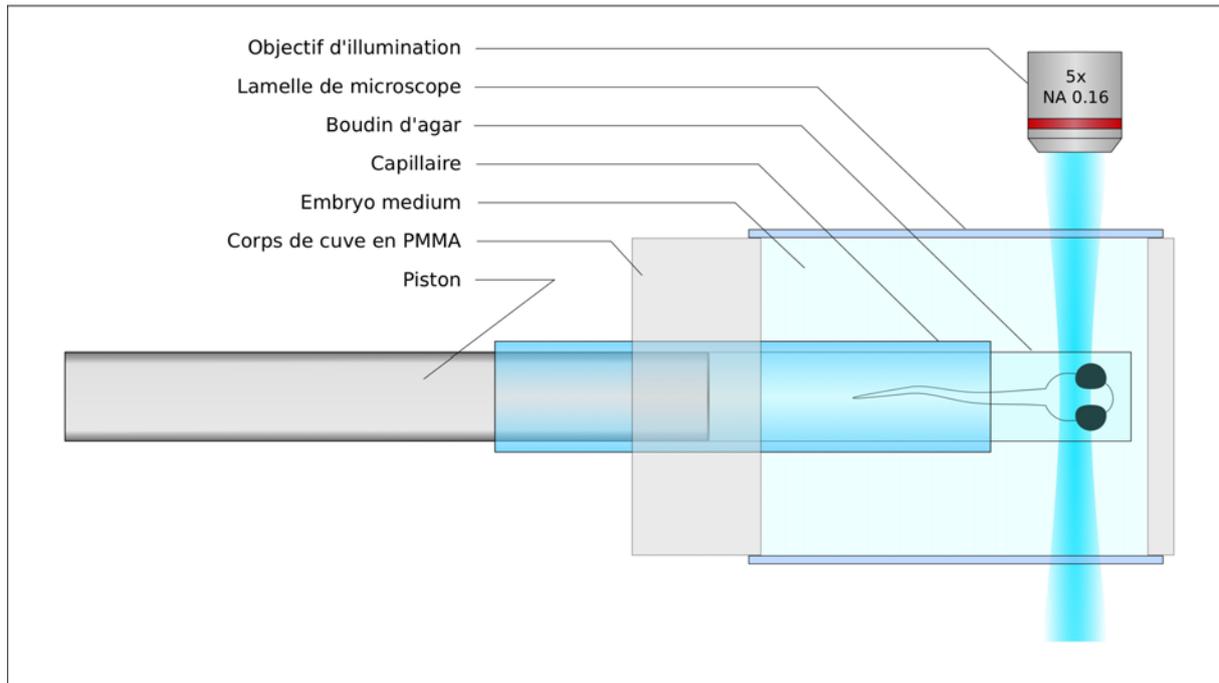


FIGURE 3.8 – Constitution de la cuve porte-échantillon. Vue de dessus.

Le reste du porte échantillon est principalement une cuve usinée dans du PMMA (équivalent du Plexiglas[®]), dont les deux faces latérales sont des lamelles de microscope pour éviter les aberrations optiques sur le trajet d'entrée de la nappe laser, et les réflexions / diffusions sur le trajet de sortie. L'un des deux côtés restants est percé pour laisser passer et maintenir en place le capillaire. L'étanchéité et le maintien sont assurés par un joint torique. Le perçage est à mi-distance entre le fond de la cuve et sa surface quand elle est remplie. Ainsi lorsque l'on éclaire l'échantillon, celui-ci est entre deux eaux et le faisceau laser, de géométrie conique à l'échelle centimétrique, n'est pas perturbé par le fond ou la surface.

Quand le capillaire et le joint torique sont en place, on remplit la cuve d'embryo

medium. On peut ensuite faire sortir le boudin d'agar qui contient la larve sans qu'il s'affaisse sous son poids, puisqu'il a la même densité que le liquide dans lequel il baigne (à quelques pourcents près). La larve, bien qu'immobilisée, est alors dans des conditions convenables de survie. Cela a été vérifié en dégageant, après plusieurs heures, une larve ayant servi dans le montage : après l'avoir remise dans son environnement de maintien, elle a repris une vie normale – autant qu'il nous était permis d'en juger.

L'avantage de ce porte échantillon est qu'il ne présente que des dioptries plans sur le trajet du laser, air / verre et verre / eau, à l'entrée dans la cuve par la lamelle de microscope. L'interface boudin d'agar / eau est certes courbe, mais la différence d'indices optiques est infime, l'agar étant constitué à 98% d'eau. Ainsi la dégradation du faisceau laser est limitée au maximum, ce qui permet de garder la finesse de la nappe à une valeur proche de sa limite théorique, mais nous gardons la possibilité de faire tourner l'échantillon pour mettre le cerveau au plus près de l'objectif d'observation. Ce qui justifie l'utilisation d'un boudin d'agar en suspension, plutôt qu'un capillaire carré – qui ne présente que des dioptries plans, à la fois du côté de l'illumination que du côté de l'observation, mais ne permet pas d'ajuster l'orientation du poisson quand il est immobilisé à l'intérieur. Dans notre montage, la rotation du poisson est assurée à la main, en faisant tourner le piston de la mini-seringue : le boudin d'agar est entraîné avec lui (figure 3.9).

La larve dans la cuve est maintenant prête à être imagée, il faut donc aligner le cerveau du poisson avec la zone la plus fine de la nappe laser. Pour cela, la cuve est montée sur une platine de translation micrométrique trois axes manuelle (Newport M-562-XYZ) et le poisson est d'abord placé, à l'œil, dans la bonne zone de la nappe. Comme il est éclairé, on peut observer son image de fluorescence à la caméra. Mais dans le cas général, le contraste est mauvais car le poisson est dans une zone où la nappe est épaisse. Pour l'alignement fin, on fait descendre le poisson bien en dessous de la nappe, puis on arrête les oscillations du miroir. On peut alors voir à l'image le

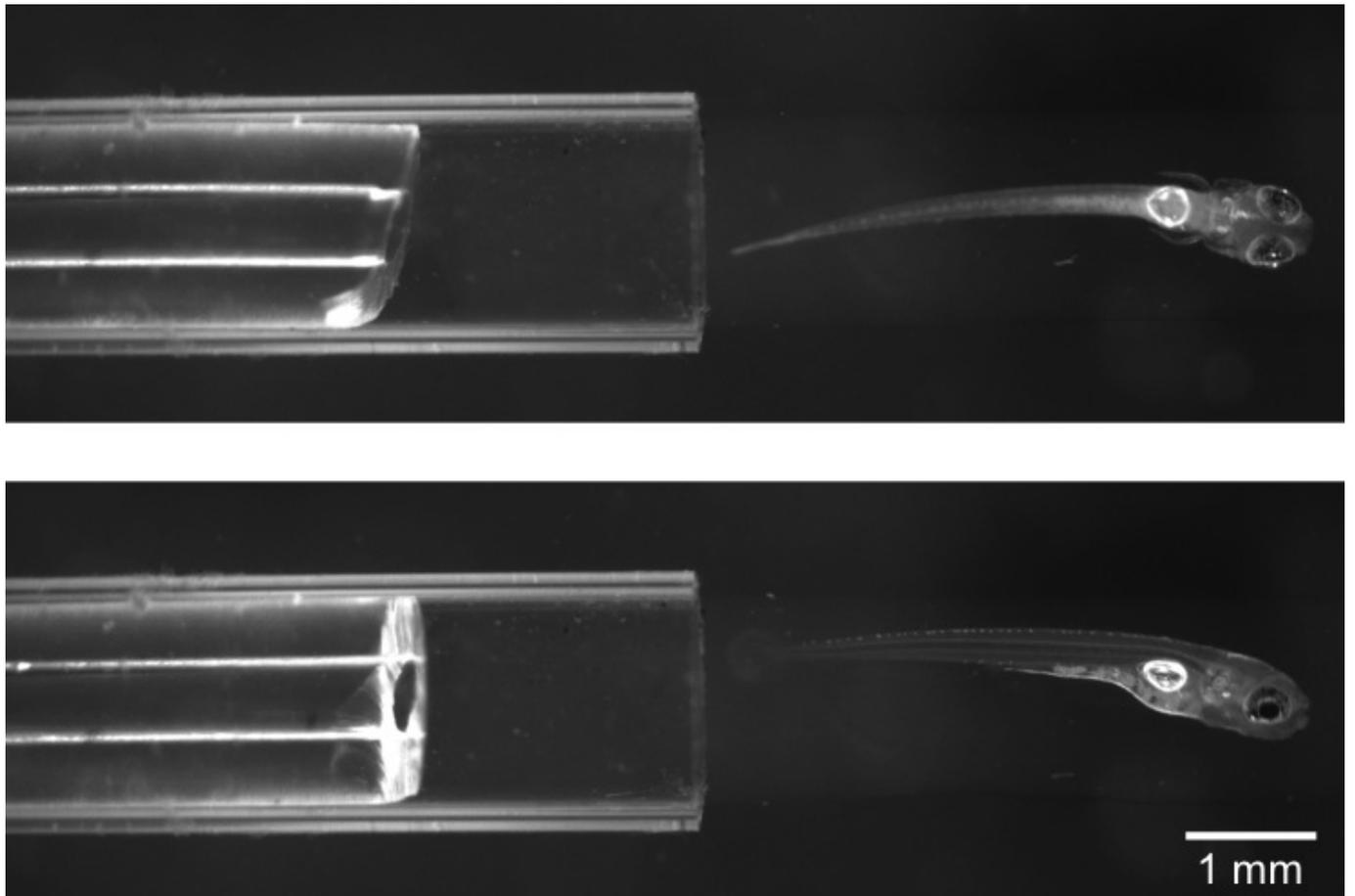


FIGURE 3.9 – Prises de vue en lumière blanche d’une larve de 5 jours avec un objectif de faible grossissement (2x). En haut : vue de dessus (orientation utilisée dans les enregistrements). En bas : vue de côté. Le poisson est exceptionnellement sorti en totalité du capillaire pour la photo. Entre les deux vues, l’opérateur a tourné le piston à la main et le gel d’agar a suivi.

faisceau laser et son point de focalisation, ainsi qu’un halo lumineux correspondant au poisson qui, plus bas, capte un peu de lumière et fluoresce (figure 3.10). La larve doit donc être descendue suffisamment pour ne pas subir les possibles dommages d’un éclairage par le laser fixe, mais pas trop pour qu’on puisse la deviner à l’écran. Il est alors simple, en déplaçant la cuve porte échantillon, de superposer le halo du poisson et le *waist* du faisceau laser. Après avoir relancé les oscillations du miroir, on peut déplacer verticalement le poisson jusqu’à ce que le cerveau soit traversé par la nappe. On a alors une image optimale.

Ce réglage doit être fait pour tout nouvel échantillon, car la position de la larve dans le boudin d’agar change légèrement à chaque fois, et déplacer l’échantillon

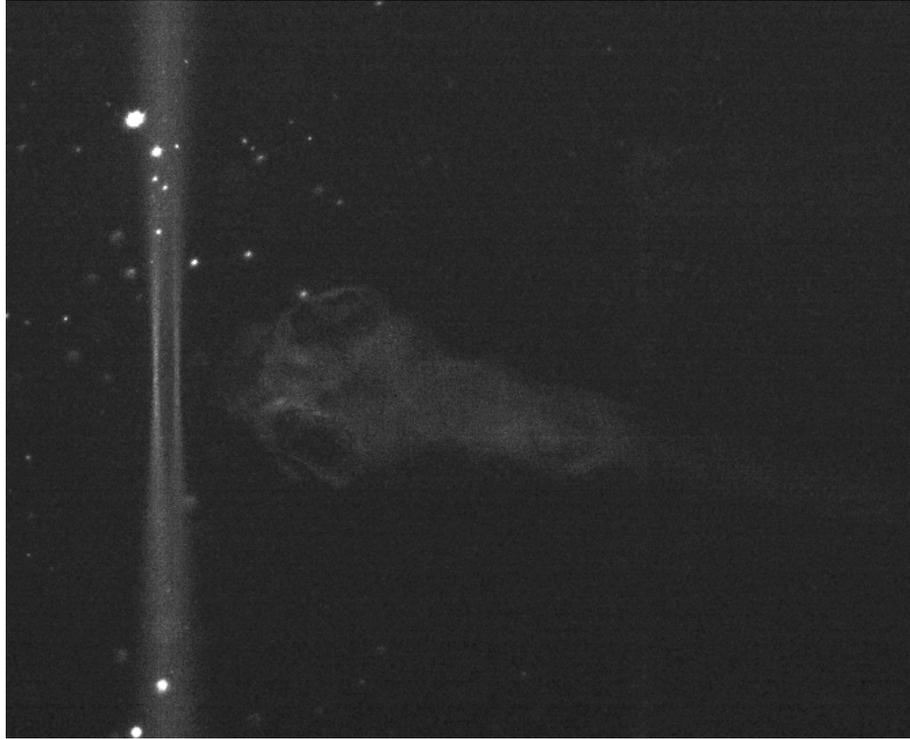


FIGURE 3.10 – Alignement du *waist* du faisceau et du cerveau du poisson. Le dédoublement du *waist* vient du bruit électrique dans la commande du miroir.

nécessite de déplacer la cuve. Le déplacement horizontal de la cuve, dans la direction de propagation du laser, change le chemin optique et la longueur focale effective de l'objectif d'illumination, et donc la position du *waist* du faisceau dans l'espace. Il serait possible de s'en affranchir avec un montage où la cuve serait fixe, donc la position du *waist* du faisceau à l'intérieur de celle-ci : il suffirait de centrer le champ de la caméra sur le *waist* une fois pour toutes, puis de centrer chaque échantillon dans le champ de la caméra. Toutefois cela nécessiterait de pouvoir déplacer l'échantillon indépendamment de la cuve, une complexité que nous avons préféré éviter. En outre ce réglage systématique nous assure d'obtenir, pour chaque échantillon, les meilleures images possibles.

3.3.3 Film sur un seul plan

Tout est maintenant en place pour filmer l'activité des neurones qui sont sur un même plan, en positionnant à la main, avec les platines, l'échantillon. La figure 3.11

montre une image extraite d'un film enregistré à 10 Hz (100 ms d'exposition). Le champ va du haut du télencéphale (en haut) au début de la moelle épinière (en bas). La protéine fluorescente présente dans le cytoplasme ne pénètre pas dans le noyau, et ce dernier est presque aussi grand que le corps cellulaire du neurone, ce qui explique l'aspect annulaire de l'image de fluorescence : les cercles brillants sont autant de neurones. Les parties uniformément blanches correspondent au neuropile, la partie du système nerveux largement dépourvu de corps cellulaires et constitué principalement de dendrites et d'axones.

Les échantillons sont d'intérêt variable selon leur préparation : il arrive que la mise au point soit impossible à faire en même temps sur l'ensemble de champ, peut être à cause d'inhomogénéités dans l'agar. Mais surtout il arrive que le poisson se voûte, rendant la visualisation simultanée du télencéphale et de la moelle épinière impossible. Schématiquement, le cas favorable revient à couper un cylindre par un plan parallèle à son axe, mais si le poisson se courbe, la coupe intercepte l'axe du cylindre et la vue est tronquée. On perd alors un peu de l'avantage de large champ du microscope.

Néanmoins, comme la position du poisson dans le boudin d'agar est déterminée au moment de l'aspiration avec la micro-seringue, il est possible de développer un certain doigté : en n'aspirant pas complètement la larve, sa partie dans le capillaire est quasi-fixe alors que sa partie toujours à l'extérieur est encore orientable en déplaçant le capillaire dans le bain d'agar liquide et visqueux. Au fur et à mesure que l'orientation est satisfaisante, on peut continuer d'aspirer la larve. Il est ainsi possible d'obtenir régulièrement des positionnements qui donnent des images telles que celle de la figure 3.11, où l'intégralité du champ de la caméra est mise à profit.

3.3.4 Image d'un volume

En ajoutant un contrôle fin et automatisé de l'altitude, il devient même possible de faire une image du volume du cerveau. Dans ce but, nous ajoutons un positionneur

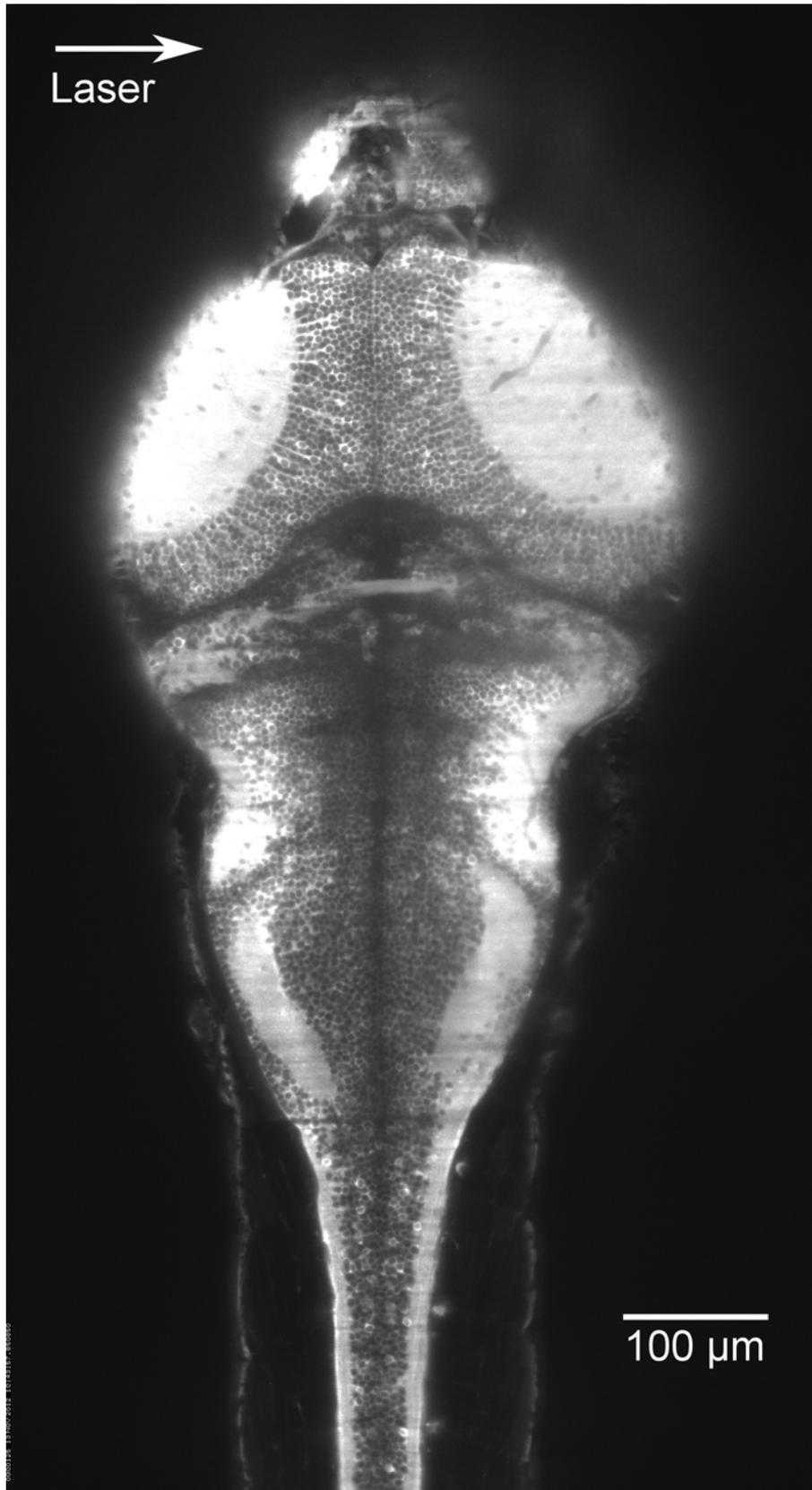


FIGURE 3.11 – Image typique d'un film à 10 Hz (100 ms d'exposition).

piezoélectrique (piezosystem jena PZ 400 OEM, 320 μm de course) sous la cuve porte-échantillon. Centraliser les commandes du piezo et de la caméra permet de les synchroniser et d'alterner rapidement prise d'image et petit déplacement, jusqu'à avoir parcouru toute la course du piezo. On a alors une image de tout le volume accessible au microscope, ce qui représente environ 80% du cerveau de la larve ¹.

Un pixel de la caméra représentant 0,4 μm dans l'espace objet, on décide de déplacer le piezo de 0,4 μm entre chaque image, pour créer des voxels cubiques. Les 320 μm de course sont donc 800 images à prendre, soit 80 secondes à 100 ms par image. Moins de deux minutes pour connaître la géographie cellule par cellule de la quasi-totalité du cerveau est une autre avancée majeure apportée par l'imagerie par nappe laser.

La figure 3.12 présente les visualisations que l'on peut tirer de l'image volumique. On voit l'utilité des voxels carré : la formation des images dans les plans orthogonaux au plan de la nappe laser se fait directement, sans interpolation. Ce n'est là qu'une image fixe, mais l'intérêt est dans la navigation dynamique dans le jeu de données, sur l'ordinateur. Il est alors facile, pour le connaisseur, de repérer toutes les frontières anatomiques et de séparer les différentes régions du cerveau. Mieux encore, lorsqu'un plan est filmé, on connaît son attitude et on peut donc retrouver chacun des neurones dans l'image 3D.

3.3.5 Film sur plusieurs plans

La microscopie par nappe laser permet d'accumuler des données 20 fois plus vite que les microscopes confocaux ou biphoton traditionnels, et on peut choisir d'utiliser ce gain pour enregistrer beaucoup plus vite le même nombre de neurones, ou beaucoup plus de neurones à la même vitesse. C'est cette dernière option que nous avons explorée en développant l'enregistrement en 3D du cerveau du poisson.

1. Ce nombre est évalué en mesurant dans nos images le volume dans lequel des neurones sont discernables. En multipliant par le nombre de neurones par unité de volume, on obtient $\sim 65\,000$ unités, sur les 80 000 présents dans la larve de cet âge (Hill 2003)

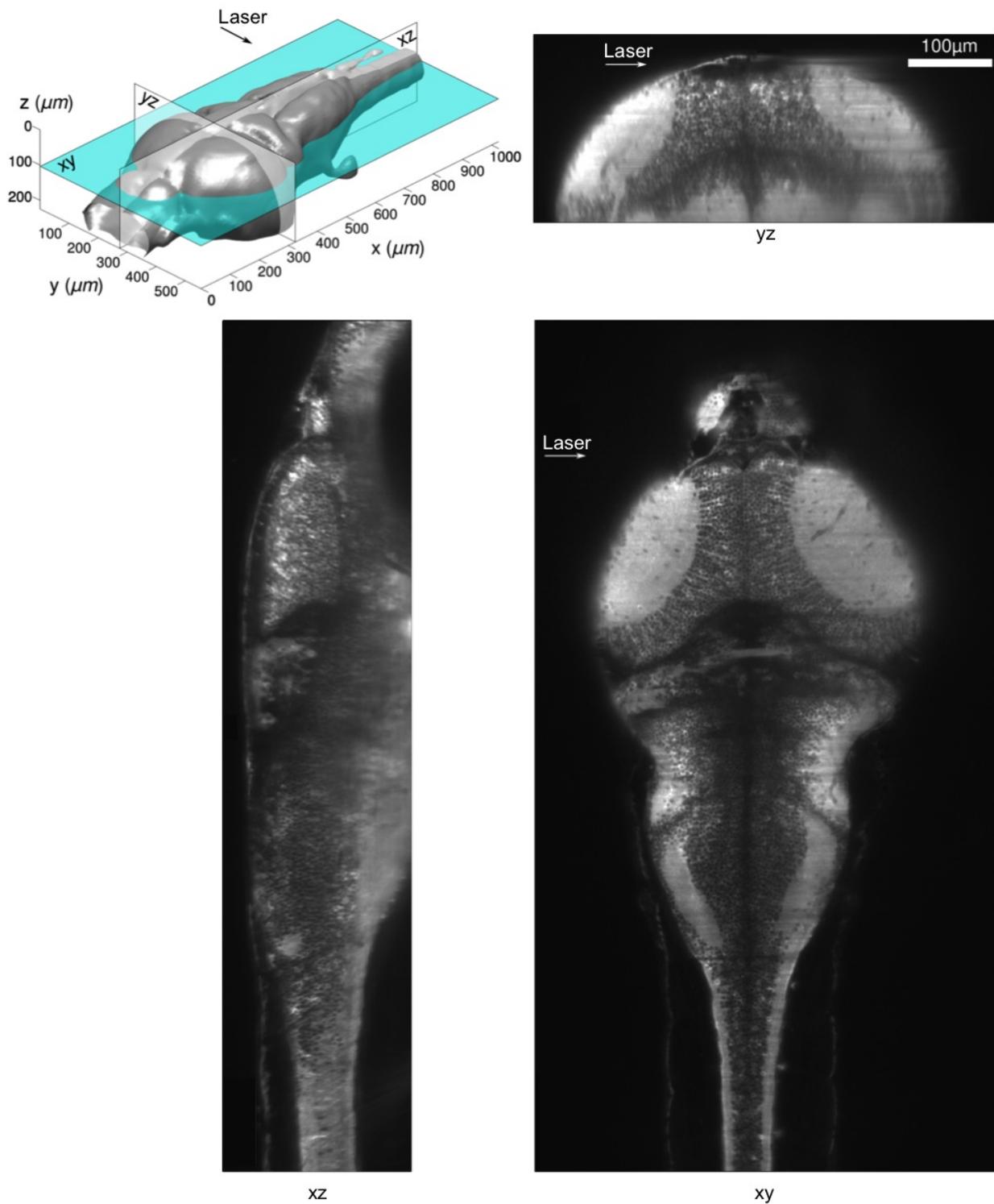


FIGURE 3.12 – Image du volume du cerveau et reconstruction 3D. xy est un des plans obtenus par la caméra. xz et yz sont reconstitués à partir de l'image en 3D.

Le principe de l'enregistrement 3D est de prendre successivement les images de plusieurs plans correspondant à différentes profondeurs dans le cerveau de l'animal, et ce de façon cyclique. Après désentrelacement des images, on obtient pour chaque tranche un film dont la fréquence est la fréquence utilisée par la caméra au moment de l'enregistrement, divisée par le nombre de tranches.

Il existe deux façons d'implémenter ce principe. On peut soit maintenir fixes la nappe laser et l'objectif d'observation, et déplacer l'échantillon entre deux prises d'image ; soit maintenir fixe l'échantillon et déplacer de concert la nappe laser et l'objectif d'observation. Cette dernière méthode requiert un deuxième miroir galvanométrique pour défléchir verticalement le faisceau laser de manière contrôlée. La précision du contrôle de ce miroir est cruciale : en effet pour une nappe horizontale le moindre bruit sur sa position verticale se traduit par un épaississement, donc une perte de contraste dans l'image.

C'est pourquoi nous avons choisi, pour commencer, de déplacer l'échantillon en utilisant le positionneur piezoélectrique. Cela pose le problème de soumettre la larve à une accélération qui n'est pas physiologique d'une part, et d'autre part de provoquer des sauts de position d'un ensemble (boudin d'agar porté au bout d'un capillaire en porte-à-faux) de faible rigidité mécanique, qui a besoin d'un délai après mouvement pour se stabiliser.

Pour minimiser les effets des déplacements, on évite les mouvements de trop grande amplitude. En particulier, on ne visite pas les couches dans l'ordre de leur altitude car le passage de la dernière à la première couche induirait une forte accélération. Visiter toutes les couches en montant, puis toutes les couches en descendant, évite au maximum les grands déplacements, mais provoque des irrégularités la prise d'images pour chaque couche. Le schéma de visite que nous avons choisi saute une couche sur deux à la montée, puis visite les couches manquées à la descente (figure 3.13). C'est comme si, dans un immeuble, on s'arrêtait aux étages impairs lors de la montée, puis aux étages pairs lors de la descente. Il n'y a ainsi bien qu'une

seule fréquence dans la prise d'image d'une couche donnée : la fréquence de la caméra divisée par le nombre de couches.

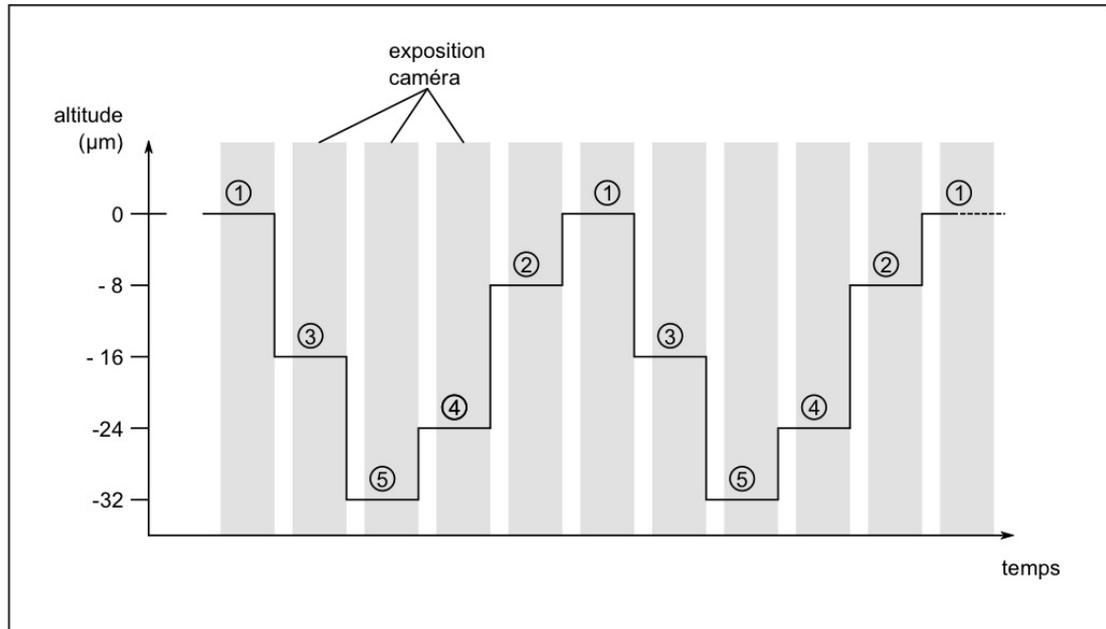


FIGURE 3.13 – Profil temporel de l'altitude imagée dans un enregistrement 3D à 5 couches et exposition synchronisée. La caméra est déclenchée 5 ms après le mouvement.

Les déplacements sont commandés par des échelons de tension en commande du piezoélectrique. On attend 5 ms avant de déclencher l'exposition de l'image, pour laisser le temps au montage de se stabiliser à sa nouvelle position. En visionnant le film désentrelacé, on constate que d'une image à l'autre, l'échantillon reprend bien sa place – aussi bien en altitude (on retrouve les mêmes neurones) que dans le plan de l'image (les neurones se superposent avec un décalage minime). En revanche, déclencher l'exposition immédiatement après la commande du mouvement produit des images floues.

Ainsi, pour faire 20 images par seconde, les 50 ms dévolues à chaque prise d'image sont partagées en 5 ms d'attente, puis 45 ms d'exposition. On perd en cela un peu de qualité d'image par rapport à un enregistrement à 20 Hz dans un seul plan, mais on peut gagner une multiplication du nombre de neurones suivis. On a le choix, par exemple, suivre 20 couches à 1 Hz ; ou 5 couches à 4 Hz pour se rapprocher des

enregistrements effectués avec un microscope biphoton.

3.3.6 Performances Optiques

La première caractéristique optique notable de notre montage est la largeur du champ enregistré : 1 mm. Cette valeur, grande par rapport à celles obtenues avec les microscopes traditionnels, permet de visualiser sur la même image l'extrême avant du cerveau et le début de la moelle épinière, tout à l'arrière. Elle est le résultat de l'utilisation d'une caméra à grand capteur (16,6 mm de large), d'un objectif de grossissement intermédiaire (20x) et d'une lentille de tube de focale inférieure à celle utilisée par le fabricant de l'objectif.

En effet les microscopes Olympus utilisent des lentilles de tube de 180 mm de focale, donc en utilisant une lentille de 150 mm, nous obtenons un grossissement effectif de $20 \times 150 / 180 = 16,6$ fois. D'où un champ image de $1 \times 0,84$ mm pour un capteur de $16,6 \times 14$ mm.

D'autre part, les pixels du capteur sont des carrés de $6,5 \mu\text{m}$ de côté, ce qui correspond à $0,4 \mu\text{m}$ dans l'échantillon. Un corps cellulaire de neurone étant de l'ordre de $7 \mu\text{m}$ en diamètre, son image recouvre donc autour de 200 pixels; un nombre conséquent qui permet, en moyennant, de limiter le bruit de lecture.

Le second point d'intérêt du montage est sa performance en termes de sectionnement optique. Celui-ci étant obtenu par l'éclairage en nappe, il est naturel de chercher à optimiser l'épaisseur de la dite nappe. Comme le montage n'est constitué que de miroirs et de lentilles sphériques, le caractère gaussien du faisceau laser est conservé jusqu'à l'échantillon. Là, le faisceau est donc décrit par son *waist*, ou largeur minimale, et par sa longueur de Rayleigh, distance sur laquelle l'épaisseur est quasi-constante.

Optique gaussienne

- Dans un plan orthogonal à la direction de propagation, l'intensité lumineuse en fonction de la distance r au centre du faisceau s'écrit : $I(r, x) = I_0(x) \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega(x)^2}\right)$
- ω , la demi-largeur à $1/e^2$, varie dans la direction de propagation en fonction de la distance x au point de largeur minimale : $\omega(x) = \omega_0 \sqrt{1 + \frac{\lambda x}{\pi \omega_0^2}}$ où ω_0 est la *waist* du faisceau et λ la longueur d'onde du laser.
- Dans la zone de Rayleigh, $|x| < x_R = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda}$, on a $w(x) \sim w_0$. Au delà, le faisceau rejoint rapidement le cône asymptotique de demi-angle au sommet $\lambda/\pi\omega_0$. Donc plus ω_0 est petit, et plus la distance de Rayleigh est courte et le faisceau divergent.
- Un faisceau collimaté de *waist* $\omega_{0,1}$ donne après passage par une lentille de focale f un faisceau de *waist* $\omega_{0,2} = \frac{f\lambda}{\pi\omega_{0,1}}$

Le fabricant du laser annonce pour le faisceau un diamètre à $1/e^2$ de 0,7 mm, soit un *waist* de 0,35 mm, qui passe à 2,3 mm après l'agrandisseur constitué des lentilles de 30 et 200 mm de focale. En assimilant l'objectif d'illumination à une lentille de 33 mm de focale, les formules précédentes prédisent un *waist* pour la nappe de 2,2 μm .

Ces calculs effectués dans un milieu d'indice optique égal à 1, permettent de justifier l'emploi des différents éléments optiques qui donnent le bon ordre de grandeur pour les paramètres géométriques du faisceau. Mais celui-ci, avant d'atteindre l'échantillon, parcourt une fraction de sa distance de focalisation dans l'eau (typiquement 50 % du trajet). Pour connaître les effets de ce changement de milieu, nous avons mis en place un protocole de mesure directe de l'épaisseur de la nappe.

Il utilise un boudin d'agar contenant des billes fluorescentes de 0,1 μm de diamètre, en concentration de 10^9 billes par mL (Molecular Probes). Compte tenu de leur faible diamètre, les billes sont assimilables à des sources ponctuelles. Quand le boudin est éclairé par la nappe laser, on peut faire la mise au point sur les billes, pour ensuite déplacer de concert l'échantillon et l'objectif d'observation. Cela revient

à déplacer la nappe éclairant un ensemble de billes fixes dans le plan focal de l'objectif. Partant d'une configuration où la nappe est bien en dessous de ces billes, qui n'émettent donc pas de fluorescence, on remonte la nappe en enregistrant les images en fonction de sa position. On extrait alors le profil d'intensité de chaque bille en fonction de l'altitude de la nappe, qui correspond à son épaisseur à cet endroit.

Chaque profil présente bien un caractère gaussien, dont l'ajustement nous donne la demi-largeur à $1/e^2$ en différents points du champ. Sur la largeur, c'est-à-dire dans la direction du scan du faisceau, on trouve l'épaisseur indépendante de la position, ce qui permet de projeter dans cette direction tous les points de mesure. On trace alors l'épaisseur en fonction de la position dans le champ dans la direction de propagation, et l'on trouve un excellent ajustement en $\omega(x) = \omega_0 \sqrt{1 + \frac{\lambda x}{\pi \omega_0^2}}$, avec ω_0 seul paramètre ajustable, donnant $\omega_0 = 2 \mu\text{m}$ (figure 3.14).

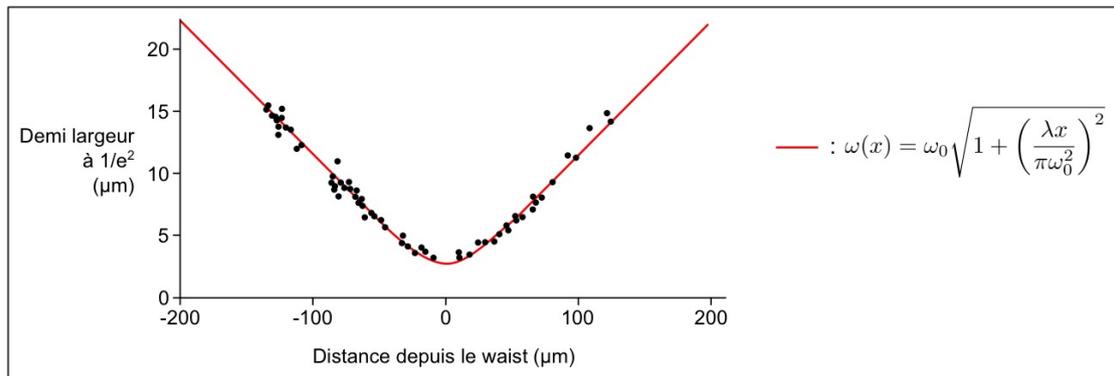


FIGURE 3.14 – Mesure et ajustement du profil d'épaisseur de la nappe dans la direction de propagation. On obtient $\omega_0 = 2 \mu\text{m}$.

Ainsi notre montage utilise une nappe avec une distance de Rayleigh de $10 \mu\text{m}$, et des demi-largeurs $1/e^2$ de $10 \mu\text{m}$ à $\pm 100 \mu\text{m}$ du *waist*, et $20 \mu\text{m}$ à $\pm 200 \mu\text{m}$ du *waist*. Ces valeurs sont données sachant que plus de 75 % des neurones sont situés à $\pm 100 \mu\text{m}$ de l'axe central et que la largeur maximum du cerveau de la larve est de $400 \mu\text{m}$.

Néanmoins, toutes les considérations précédentes laissent de côté les pertes de performances qu'implique forcément la traversée du poisson, milieu hétérogène qui

dégrade à la fois la nappe, et l'image récupérée. Pour évaluer ces effets, nous avons étudié l'évolution du contraste en fonction de la profondeur imagée, dans des sous-parties d'enregistrements volumiques de section $40 \times 60 \mu\text{m}$ et de profondeur $100 \mu\text{m}$. Elles traversent le mésencéphale à proximité du plan dorso-ventral et commencent dès les premières couches de neurones en haut du cerveau.

On a alors dans ces sous-parties un volume uniquement rempli de neurones, sans frontière entre deux zones anatomiques. Le contraste de chaque tranche est défini par la moyenne de la différence entre les pixels les plus brillants (98^{e} décile) et les pixels les plus sombres (2^{e} décile). En traçant la variation du contraste, normalisé par sa valeur en haut du cerveau, en fonction de la profondeur, on a en moyenne une diminution de $40 \pm 5\%$ à $100 \mu\text{m}$ de profondeur (figure 3.15). Cela mesure les pertes dues à la diffusion dans ces $100 \mu\text{m}$ lors de la remontée des photons de fluorescence vers l'objectif d'observation, mais aussi les pertes dues à la propagation de la nappe qui, en haut, traverse $50 \mu\text{m}$ de poisson avant d'arriver dans la sous-partie d'intérêt et, en bas, traverse $200 \mu\text{m}$.

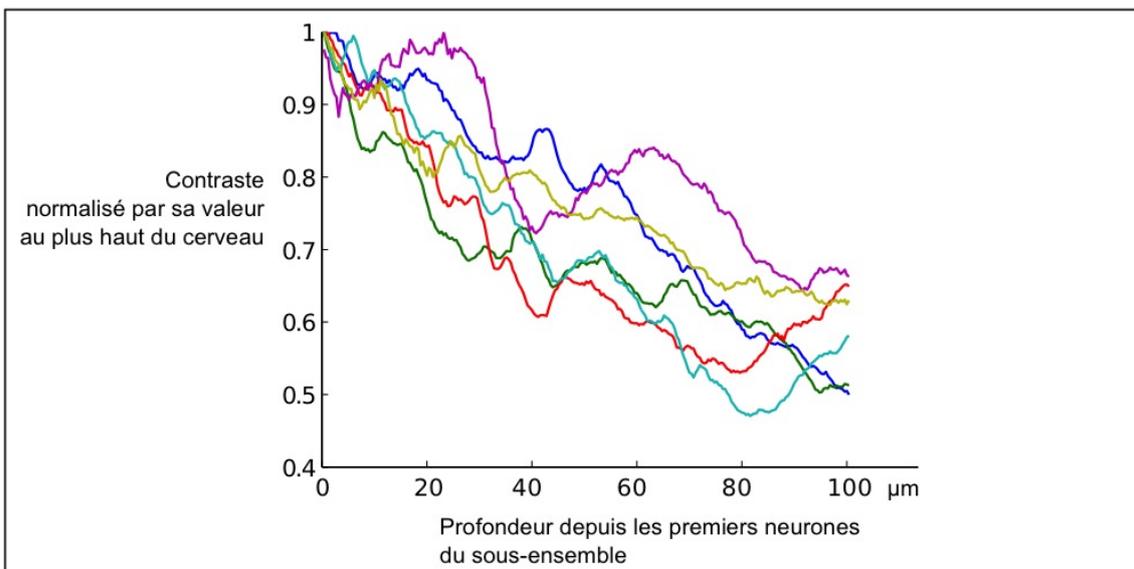


FIGURE 3.15 – Évolution du contraste dans des sous-parties du cerveau proches de la ligne centrale en fonction de la profondeur.

Puissance Laser	Perte moyenne de fluorescence en 30 minutes
2 mW	Négligeable
4 mW	Jusqu'à 5%
6 mW	Entre 5 et 10 %
15 mW	Entre 10 et 35 %
20 mW	Entre 20 et 50 %

FIGURE 3.16 – Quantification du photo-blanchiment en fonction de la puissance laser injectée. Largeur de scan au niveau du poisson : 2 mm.

3.3.7 Photo-blanchiment

Toute la géométrie de la nappe étant fixée, il reste à faire le choix de la puissance du laser.

Pour maximiser le rapport signal/bruit, toutes choses étant égales par ailleurs, on a intérêt à injecter le plus de puissance possible, pour récupérer un maximum de photons. En pratique, il y a une borne supérieure à la fréquence d'émission de photons par un fluorophore, donc au delà d'une certaine puissance, il y a saturation et le nombre de photons émis n'augmente plus.

D'autre part, une trop forte sollicitation des fluorophores accélère drastiquement leur dégradation, ce qui se traduit par une augmentation du photo-blanchiment. Le blanchiment est bien sûr à éviter lorsque l'on envisage de longs enregistrements, mais encore les produits de dégradation sont en général toxiques.

Ces raisons font qu'il est inutile et dommageable de trop pousser la puissance du laser. Pour trouver le réglage optimal, on étudie le blanchiment en fonction de la puissance. Le blanchiment est estimé à partir de l'enregistrement d'un plan fixe dans le cerveau, éclairé en continu, en traçant la fluorescence moyenne en fonction du temps.

On note que sur des temps de l'ordre de la demi-heure, le blanchiment est négligeable sous 2 mW et devient important après 20 mW. Sachant que les utilisateurs de microscopes bi-photon n'hésitent pas à aller jusqu'à des blanchiments de 15 % en 10 minutes, nous choisissons dans un premier temps de faire nos enregistrements

à 20 mW afin de maximiser le contraste.

Les images obtenues sont de très bonne qualité, malheureusement nous n'observons quasi aucune variation dans la fluorescence des neurones individuels, traduisant une activité calcique. Du moins jusqu'à ce que nous testions des puissances inférieures (15, 10, 6, 4, 2 mW), car c'est alors que les signaux sont devenus de plus en plus évidents à voir à l'œil.

Pour interpréter ce phénomène, nous avons successivement et sur le même spécimen utilisé les puissances de 6 mW, 20 mW puis 6 mW. Sur le premier film à 6 mW l'activité est visible. Sur le film à 20 mW on ne la voit pas. Sur le second film à 6 mW elle est de nouveau visible. Ce côté réversible nous pousse à y voir un effet de saturation, sans dégradation des rapporteurs calciques.

L'efficacité quantique du rapporteur GCaMP3 quand il est complexé au calcium est dix fois supérieure à celle du rapporteur libre, il est donc vraisemblable qu'il sature à une puissance dix fois moindre. En prenant le blanchiment comme signature du début de la saturation, on a vu que le rapporteur libre commençait à saturer près de 20 mW. C'est ainsi que, pour être à la limite de saturation du rapporteur complexé et optimiser le rapport signal/bruit, nous avons choisi en définitive de travailler avec une puissance laser de 2 mW.

Modèle simpliste pour la disparition du signal à forte puissance.

Si l'on note F_T la fluorescence totale d'une cellule, α la fraction complexée du rapporteur, b_c sa brillance quand il est complexé et b_l sa brillance lorsqu'il est libre, on a :

$$F_T = \alpha b_c + (1 - \alpha)b_l = b_l + \alpha(b_c - b_l)$$

Ce sont les variations de α qui nous intéressent, donc b_l apparaît comme une ligne de base, et $(b_c - b_l)$ comme le facteur de contraste du signal recherché. On modélise la dépendance de b_c et b_l en fonction de l'intensité P de l'excitation comme suit : les

brillances augmentent linéairement avec P jusqu'à saturer. On note $P_{s,c}$ et $P_{s,l}$ les intensités de saturation de la forme complexée et de la forme libre respectivement, et on suppose que les brillances à saturation sont les mêmes. La figure 3.17 montre alors l'évolution du facteur de contraste en fonction de P , qui explique notre choix de travailler à 2 mW de puissance laser.

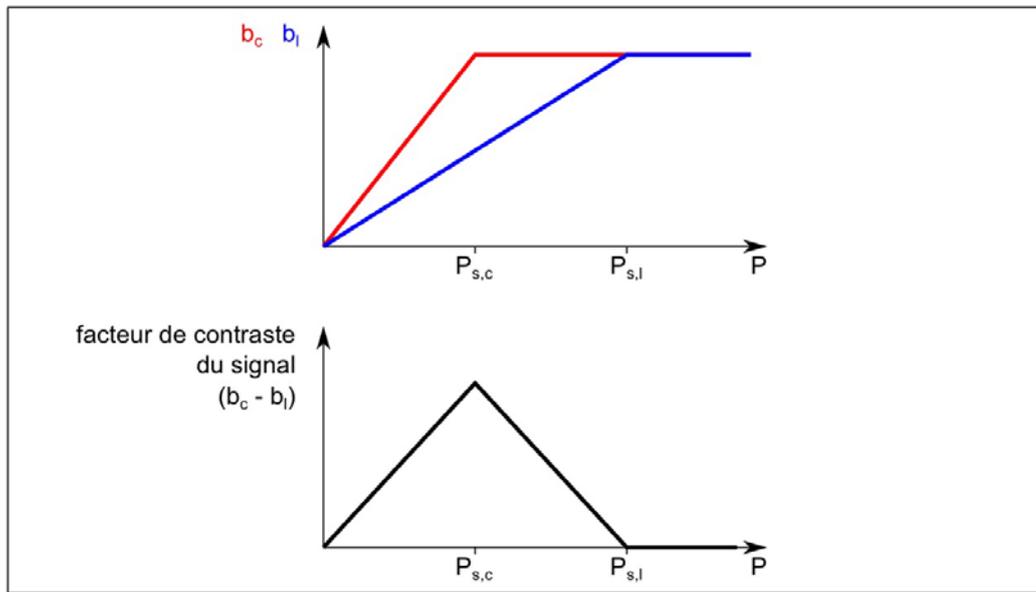


FIGURE 3.17 – Évolution des brillances du rapporteur complexé (b_c) ou libre (b_l) et du facteur de contraste en fonction de l'intensité de l'excitation P .

En réalité, la variation des brillances en fonction de l'intensité d'excitation n'est pas aussi simple qu'une évolution linéaire, de même que les brillances de saturation peuvent être différentes, mais il reste que le facteur de contraste pour le signal qui nous intéresse sera maximum à la saturation des rapporteurs complexés.

On pourrait craindre que les rapporteurs ainsi sollicités se dégraderaient, entraînant une diminution du signal. Mais nos enregistrements montrent que l'intensité moyenne du signal ne varie pas, même au cours d'enregistrements de plus de 30 minutes.

3.3.8 Autres options

Comme précisé en début de chapitre, le montage n'a pas toujours été tel qu'il vient d'être présenté. Voici trois autres configurations qui ont été mises en place et testées au cours du développement, mais qui donnent de moins bons résultats.

3.3.9 Lentille cylindrique

Utiliser une lentille cylindrique est la façon la plus simple d'obtenir une illumination qui s'approche d'une nappe. Contrairement à la lentille sphérique convergente qui focalise un large faisceau collimaté en une petite tache en son point focal, la lentille cylindrique convergente, orientée de façon à être invariante par translation horizontale et perpendiculaire à la direction de propagation, ne focalise que dans la direction verticale et crée une ligne horizontale dans son plan focal image. Dans un voisinage du plan focal, l'illumination se concentre sur un plan horizontal. C'est la géométrie utilisée par Holy (Holekamp 2008).

Pour décrire le profil d'illumination, on peut dire que dans chaque coupe verticale et parallèle à la direction de propagation, tout se passe comme si le faisceau passait par une lentille sphérique. on peut donc calculer le *waist* côté échantillon en fonction de la hauteur éclairée côté lentille. La tache d'illumination sur la lentille étant circulaire, le *waist* dépend de la position, même dans la direction d'invariance de la lentille (figure 3.18).

Le gros avantage de l'utilisation d'une lentille cylindrique est l'éclairage en continu dans le temps du specimen, plutôt que l'éclairage en « peigne de Dirac » du faisceau scanné. Tout d'abord cela évite les effets stroboscopiques qui peuvent apparaître en fonctions des fréquences de scan et de prise d'image. Ensuite, le photo-blanchiment étant un phénomène fortement non-linéaire, il est moins marqué avec un éclairage uniforme qu'avec un éclairage pulsé de même puissance moyenne. Pourtant nous avons écarté cette solution technique car elle produit de moins bonnes images : il apparaît des zones d'ombre qui donnent un aspect rayé à l'illumination (figure 3.19).

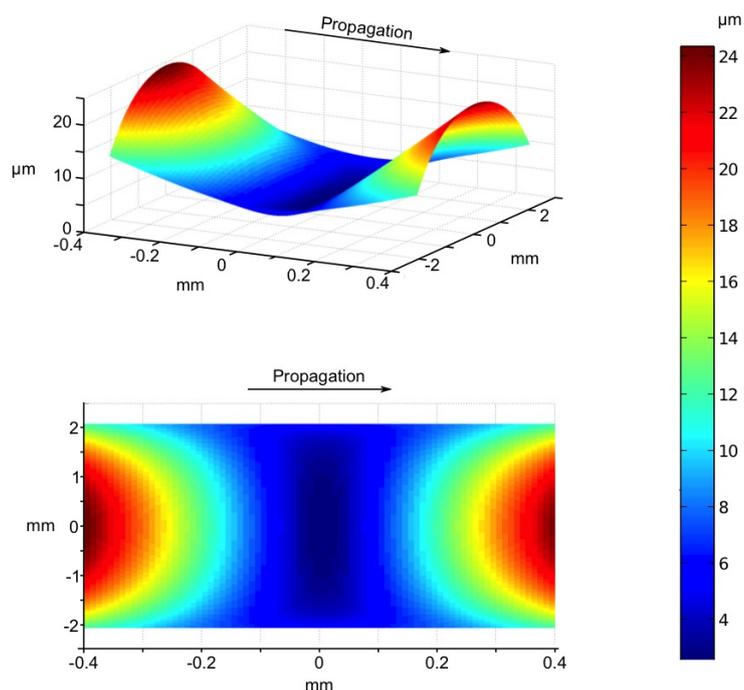


FIGURE 3.18 – Demi-épaisseur à $1/e^2$ de la nappe créée par une lentille cylindrique de 38 mm de distance focale éclairée par une tache circulaire de 4,6 mm de diamètre, en fonction de la position dans le champ.

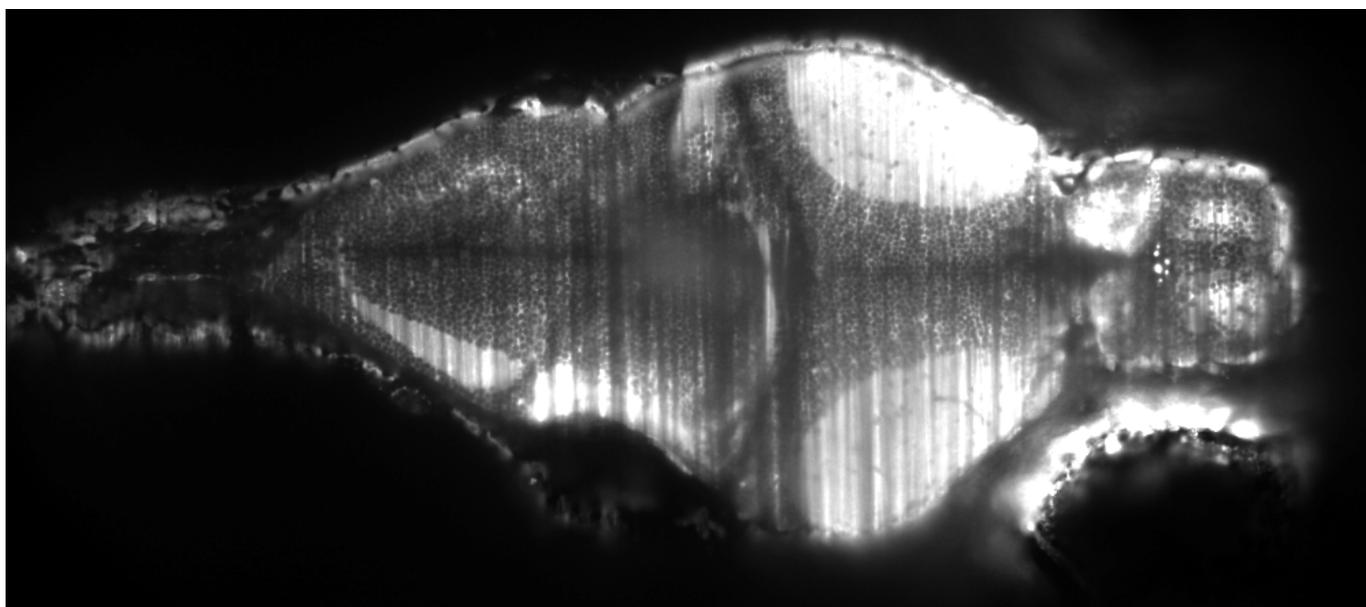


FIGURE 3.19 – Image typique donnée par le montage avec lentille cylindrique.

L'illumination est en fait plus sensible aux obstacles quand elle est créée par une lentille cylindrique que quand elle provient d'un faisceau scanné. Avec une lentille cylindrique, un point donné de l'échantillon est schématiquement éclairé par une

ligne-source de longueur D , alors qu'avec un faisceau scanné, le même point est éclairé par un disque-source de diamètre D (figure 3.20). Si un obstacle de dimension d est placé entre la source et le point considéré, il intercepte une fraction d/D de l'éclairement dans le cas de la lentille cylindrique, contre une fraction $(d/D)^2$ dans le cas du faisceau scanné. Toutes choses égales par ailleurs, cette dernière méthode donne donc un éclairage plus uniforme, ce que nous constatons sur les images.

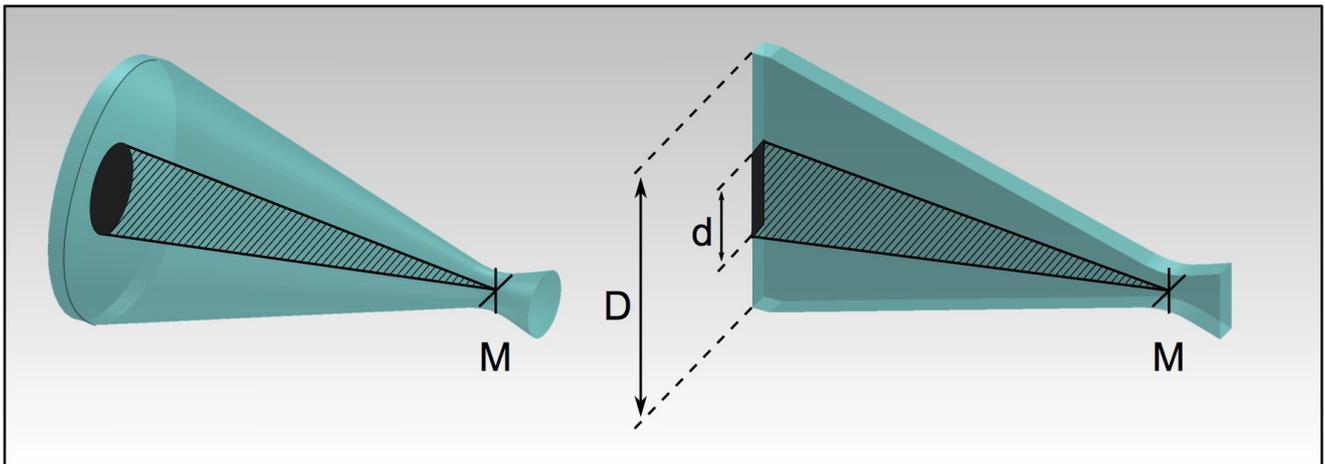


FIGURE 3.20 – Géométrie de l'illumination et ombre portée au point M. Un même défaut de taille d occulte une plus grande fraction de l'illumination avec une lentille cylindrique (à droite) qu'avec une lentille sphérique (à gauche).

D'autre part, il faut noter qu'avec une lentille cylindrique, il est impossible « d'arrêter le scan » pour aligner le *waist* et le poisson, ce réglage est donc bien moins bon qu'avec le faisceau scanné.

3.3.10 Faisceau scanné - nappe moins focalisée

Une autre configuration que nous avons essayée utilise pour l'agrandisseur de faisceau un couple de lentilles de 30 et 100 mm de focales, portant à 1,17 mm le *waist* du faisceau avant passage dans l'objectif d'illumination. Le *waist* de la nappe est alors agrandi à $4,4 \mu\text{m}$ et la distance de Rayleigh rallongée à $125 \mu\text{m}$. Aux limites du cerveau, la demi-épaisseur à $1/e^2$ vaut $7 \mu\text{m}$.

L'intérêt de cette configuration par rapport à celle exposée jusqu'ici était de

limiter l'épaisseur de la nappe aux limites du cerveau pour moins éclairer les neurones hors plan focal et prétendre à l'enregistrement de l'activité de cellules uniques sur tout le champ.

Or il se produit, comme dans le cas de l'illumination par la lentille cylindrique, que la qualité des image est dégradée par des rayures d'ombre plus prononcées. Nous y donnons une explication similaire : le diamètre du disque source étant divisé par deux, un obstacle qui bloquait une fraction $(d/D)^2$ de la lumière en bloquerait $(d/(D/2))^2 = 4.(d/D)^2$, soit quatre fois plus qu'avec la configuration que nous avons choisi.

Nous préférons donc travailler avec une nappe plus large sur les bords donnant de meilleures images, d'autant que la PSF totale du couple illumination/observation reste contenue dans dans un volume de taille comparable aux neurones.

3.3.11 Axicon

Pour s'affranchir du compromis entre l'épaisseur de nappe et la longueur de Rayleigh inhérent aux faisceaux gaussiens, la solution est d'utiliser un faisceau non-gaussien. Le meilleur candidat est alors le faisceau de Bessel, dont le lobe central est long, fin et auto-guéissant (un obstacle donne lieu à une ombre, mais on retrouve le faisceau un peu plus loin dans la direction de propagation). On obtiendrait un tel faisceau avec une lentille conique (axicon) de diamètre infini, éclairé par une onde plane [50, 51, 52]. Dans ces conditions, l'éclairement dans l'espace image sur une surface perpendiculaire à l'axe optique vérifie : $I(r) \propto J_0^2(kr \sin \beta)$, avec J_0 la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre 0, r la distance à l'axe, k le nombre d'onde et β l'angle de déviation par l'axicon (figure 3.21). L'éclairement ne dépendant pas de la distance à la lentille, le faisceau est dit non-diffractant.

En pratique, on éclaire un axicon de taille finie avec un faisceau gaussien, et on obtient un faisceau dont l'éclairement approxime un faisceau de Bessel dans une zone limitée de l'espace objet, sur une distance de l'ordre de $L = \omega_0 / \tan \beta$ (figure 3.22).

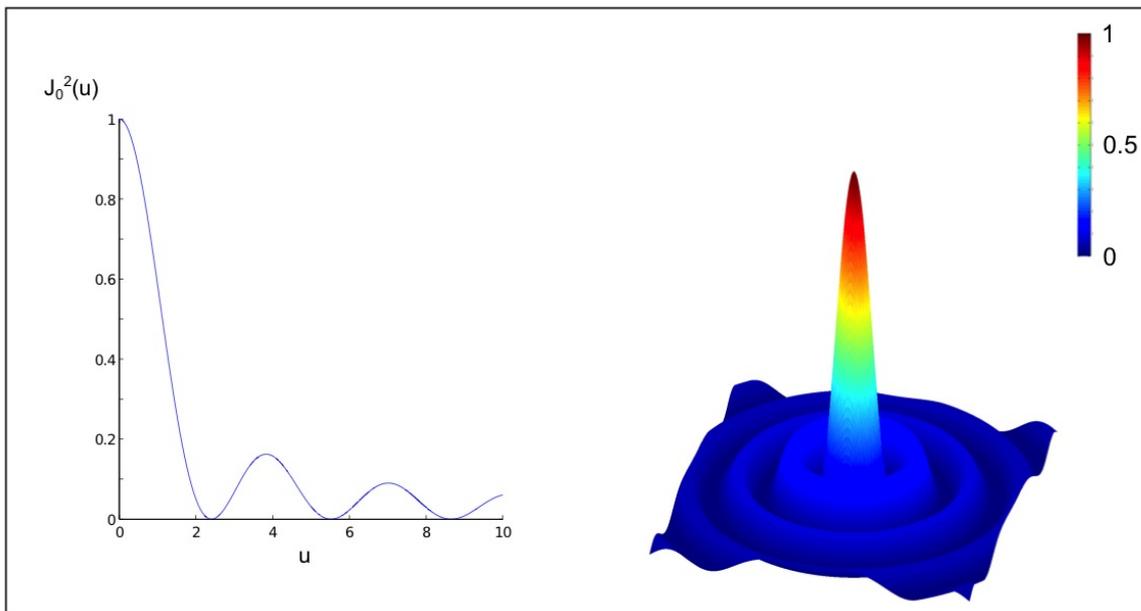


FIGURE 3.21 – Représentations graphiques de J_0^2 . Le premier zéro est pour $u = 2,40$.

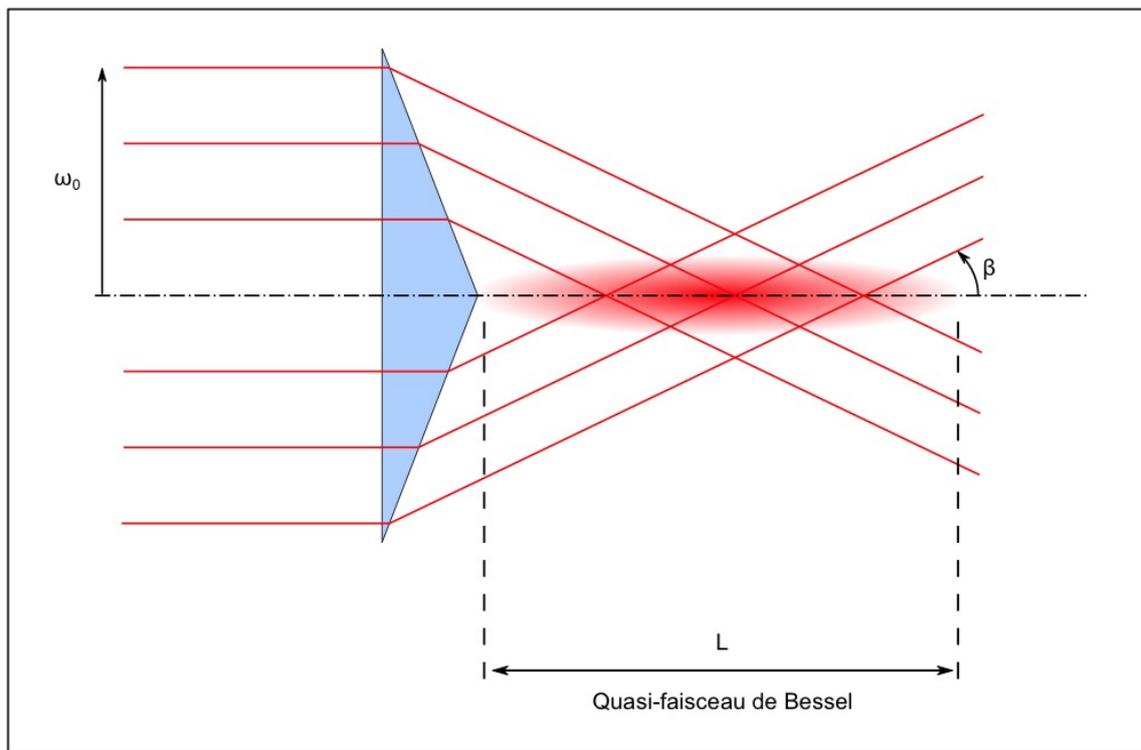


FIGURE 3.22 – Faisceau de Bessel approximé par un faisceau gaussien passant par un axicon.

Comme $J_0(u)$ s'annule pour la première fois en $u = 2,40$, le lobe principal de $J_0^2(kr \sin \beta)$ a pour rayon $r_0 = 2,40/k \sin \beta = 0,38\lambda/\sin \beta$. Avec β de l'ordre de 0,1 radian, on obtient r_0 de l'ordre de $2 \mu\text{m}$ et $L = \omega_0/\tan \beta$ centimétrique.

C'est devant ces valeurs prometteuses que nous avons voulu tester un montage avec axicon. Nous pensions que l'éclairement serait majoritairement donné par le lobe central qui, scanné, aurait donné une nappe très fine sur une longue distance. Nous pensions que les lobes secondaires de J_0^2 ne compromettraient pas trop le contraste. En pratique, nous avons perdu le sectionnement optique : le contraste s'est évanoui.

Ainsi, pour un microscope « un photon » où l'émission de fluorescence est proportionnelle à l'intensité de l'éclairement, le faisceau de Bessel n'est pas fonctionnel. Cependant il semble être une bonne idée à implémenter sur une version bi-photon du microscope à nappe laser, où l'émission de fluorescence est proportionnelle au carré de l'intensité de l'éclairement, ce qui diminue d'autant l'importance des lobes secondaires à côté du lobe principal. De bons résultats existent en imagerie structurale [53].

3.4 Extraction et traitement des signaux calciques

3.4.1 Segmentation automatique

Les images que nous obtenons font apparaître plusieurs milliers de corps cellulaires, dont le détourage manuel représenterait un travail colossal, même pour un seul film. Il était donc naturel de développer un programme de traitement d'image pour automatiser la segmentation en neurones, avec un minimum d'intervention de l'utilisateur.

Les grandes lignes de ce programme, détaillées ci-après, sont :

- Définition de la zone d'intérêt
- Création de l'image moyenne
- Filtrages
- Détermination de la ligne de partage des eaux (Algorithme de « watershed »)

La zone d'intérêt est tracée à la main, sur la première image du film, pour englober tous les neurones visibles ainsi que le neuropile, soit les zones susceptibles de présenter des variations significatives de fluorescence (figure 3.23). Le reste de l'image n'est pas soumis aux traitements qui suivent, pour optimiser le temps de calcul.

Moyenner toutes les images du film permet d'améliorer grandement le contraste et de diminuer le bruit, donc de fiabiliser la segmentation. Cependant, effectuer la moyenne directement ne donne pas un résultat satisfaisant : le film montre en effet que l'échantillon est soumis à des vibrations rapides de petite amplitude (de l'ordre du pixel) et à une dérive lente qui peut atteindre quelques microns (dûe à un possible gonflement du gel d'agar et à une dérive mécanique des platines de positionnement de la caméra). On détermine donc, pour chaque image, le vecteur déplacement qui maximise la corrélation avec la première image ; et l'image moyenne est formée à partir de toutes les images recalées (figure 3.24).

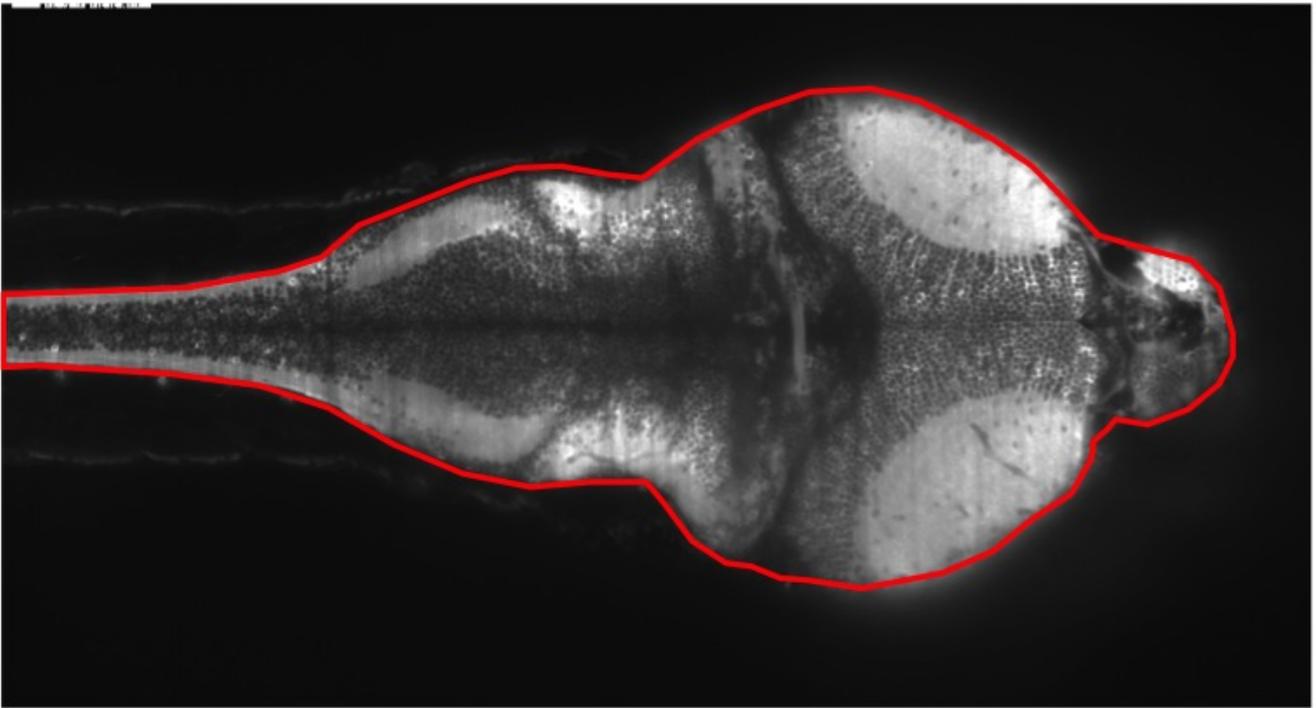


FIGURE 3.23 – Exemple de délimitation de la zone d'intérêt

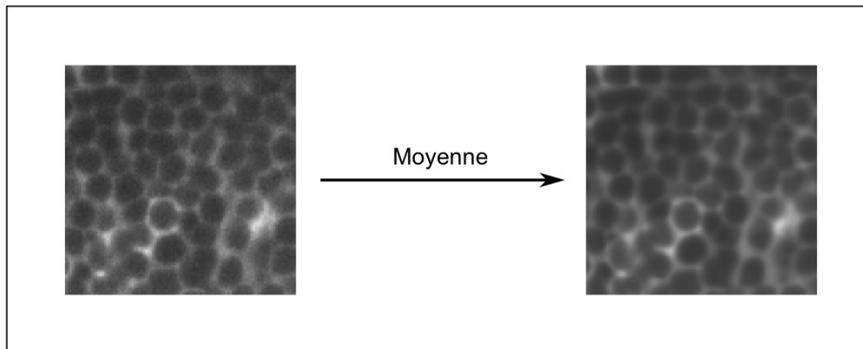


FIGURE 3.24 – Zoom sur une image brute (à gauche) et sur le résultat du moyennage des 18 000 images du film de 30 minutes à 10 Hz (à droite).

Cette image est alors traitée par un filtre passe-bas gaussien d'écart-type 2,5 pixels dans une fenêtre de 5x5 pixels. La taille de cette dernière est légèrement inférieure à la moitié de celle d'un neurone, ce qui permet d'atténuer le bruit sans trop flouter la structure de l'image à l'échelle qui nous intéresse. Ensuite on normalise le contraste local : pour chaque pixel i l'ancienne valeur a_i est remplacée par la nouvelle valeur n_i telle que $n_i = \frac{a_i - \min_i}{\max_i - \min_i}$, où \min_i et \max_i sont respectivement

le deuxième et le huitième décile des intensités des pixels compris dans une fenêtre de 5x5 centrée sur le pixel i (figure 3.25). L'image résultante est ensuite soumise au même filtre gaussien que précédemment.

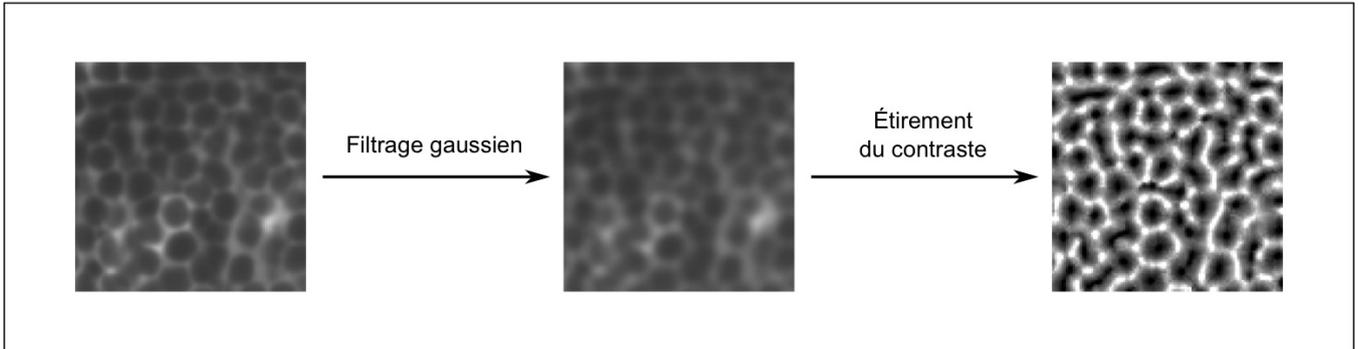


FIGURE 3.25 – Résultats du filtrage gaussien et de l'étirement du contraste appliqués à l'image moyenne.

Enfin, le résultat de ces traitements est soumis à un algorithme de ligne de partage des eaux (la fonction watershed de MATLAB) qui partitionne l'image en zones encerclées par une ligne de maxima locaux (figure 3.26). Le principe de cet algorithme est de considérer l'image comme un relief : l'intensité d'un pixel correspond à l'altitude du terrain à ces coordonnées, et d'inonder le relief par la pluie. Chaque bassin hydrographique se remplit à partir d'un minimum local, et quand le niveau atteint l'altitude d'un « col » on imagine construire une digue avant que les bassins ne se rejoignent. Lorsque le niveau d'eau dépasse le plus haut sommet, toute la carte est partitionnée par ces digues. Étant donné que, dans nos images, les frontières entre cellules sont les zones les plus brillantes, une zone résultant de ce partitionnement correspond en général à un neurone.

Cependant, ce processus détecte aussi des objets qui ne sont pas des neurones. On les exclut a posteriori sur des considérations géométriques : les objets suivis doivent avoir une surface comprise entre 40 et 400 pixels (ce qui correspond, pour des objets circulaires, à des diamètres réels de 3 à 9 μm) et une « excentricité » de l'ellipse équivalente inférieure à 0.85 (l'excentricité est ici le rapport entre la distance séparant les foyers de l'ellipse et le grand axe de l'ellipse : elle vaut 0 pour un cercle

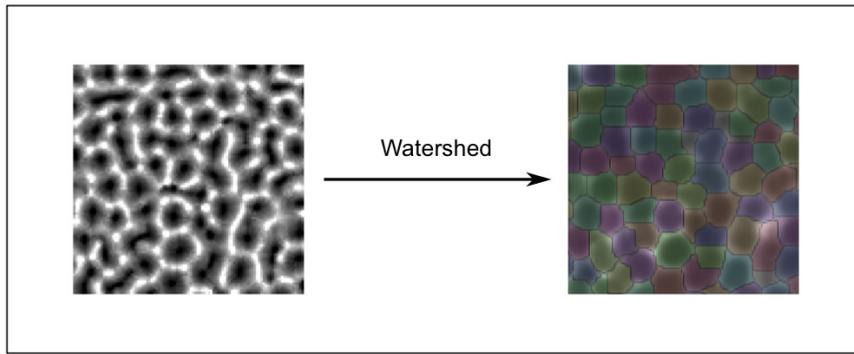


FIGURE 3.26 – Résultat de la segmentation par l’algorithme de ligne de partage des eaux.

et 1 pour un segment de droite). Après cette sélection, il est courant d’avoir plus de 5000 neurones à suivre sur un seul plan.

Maintenant que les positions des neurones sont identifiées dans l’image moyenne, on peut, pour chaque cellule, moyenner l’intensité de fluorescence sur l’ensemble des pixels qui lui correspondent dans chaque image du film. Pour cela, on réutilise les déplacements qui ont servi à recalibrer les images lors de la formation de l’image moyenne. On obtient alors le signal temporel de la fluorescence de tous les neurones présents à l’image. Au total, la procédure prend une heure pour 10 000 images.

3.4.2 Traitement des signaux

À partir des signaux de fluorescence bruts, on souhaite maintenant extraire l’activité neuronale sous-jacente. La première chose à faire est de soustraire la valeur du noir de la caméra, qui correspond principalement à un offset configuré par le constructeur, et à de la lumière parasite. Ce noir est estimé en moyennant la valeur des pixels d’une zone hors du poisson, dans l’image moyenne.

On calcule alors la ligne de base : c’est le niveau de fluorescence du neurone, exception faite des moments d’activité. Comme l’activité ne génère que des augmentations de la fluorescence, on définit la ligne de base $b(t)$ en chaque point t comme le 8^e centile des valeurs prises par le signal dans une fenêtre de 30 s centrée sur t (figure 3.27-A).

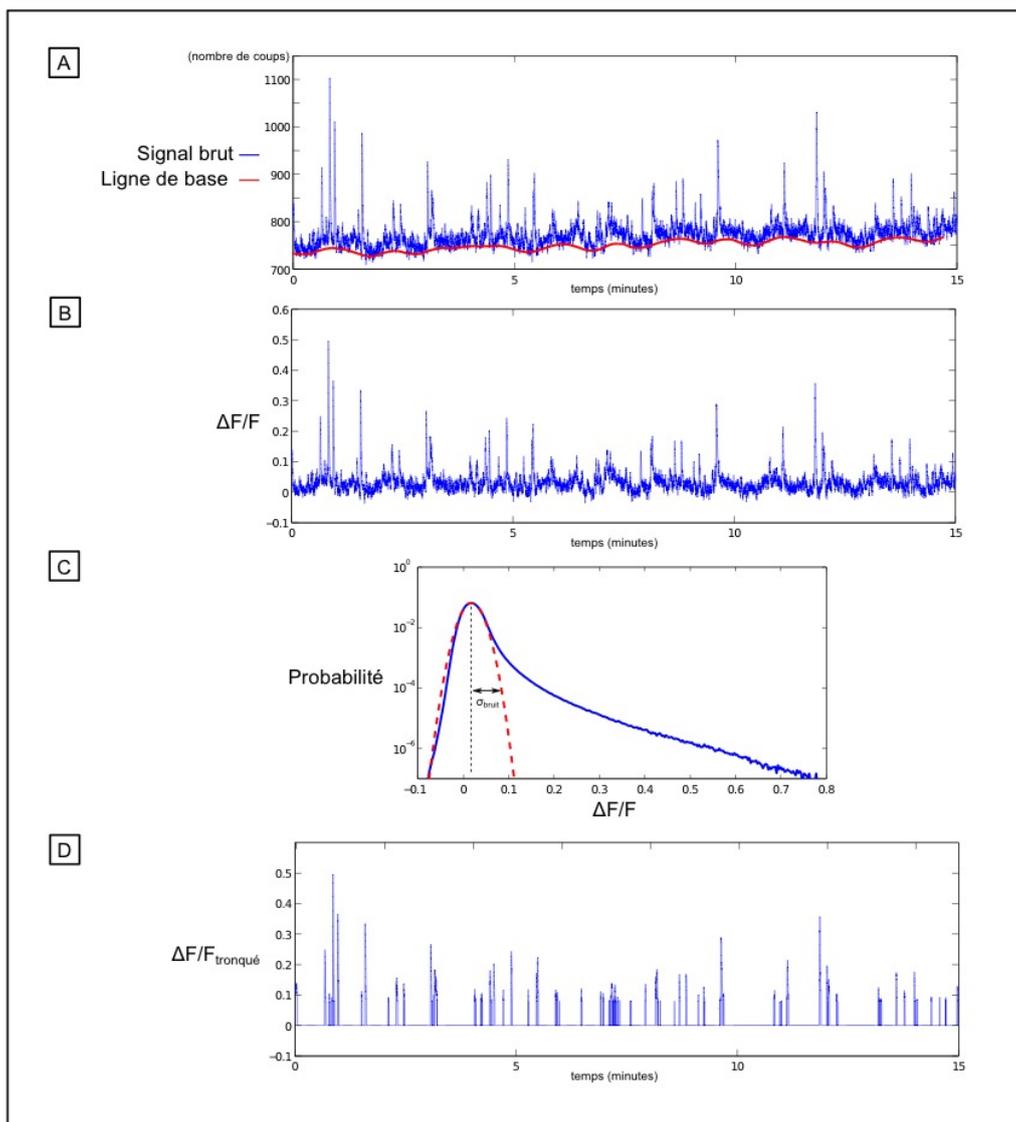


FIGURE 3.27 – Exemple de traitement du signal. A : Signal brut et ligne de base de l'intensité de fluorescence moyenne d'un neurone. B : Variation relative du signal. C : Distribution des valeurs prises par $\Delta F/F$ et largeur du bruit gaussien. D : Signal tronqué où toutes les valeurs de $\Delta F/F$ inférieures à $3\sigma_{bruit}$ ont été mises à zéro.

La ligne de base sert à calculer la variation relative d'intensité de fluorescence, $\Delta F/F = \frac{F(t) - b(t)}{b(t)}$ (figure 3.27-B). Cette grandeur s'est imposée en imagerie calcique pour représenter le signal en s'affranchissant des variations lentes qui peuvent venir des fluctuations du laser, du photo-blanchiment ou de processus biologiques autres que l'activité neuronale.

L'étape suivante est de déterminer le niveau de bruit dans le signal. Pour cela,

on trace la distribution des valeurs prises par $\Delta F/F$ (figure 3.27-C) : on remarque nettement l'asymétrie vers les valeurs positives, signature de l'activité. La partie négative de la distribution, par contre, ne peut pas être due à l'activité, elle est donc caractéristique du bruit. Elle est d'ailleurs bien ajustée par une gaussienne de largeur σ_{bruit} , largeur que l'on prend comme mesure du niveau de bruit dans l'enregistrement.

Connaître la valeur du bruit permet de se donner un premier critère sur ce qui est de l'activité et ce qui n'en est pas. En pratique, nous choisissons de tronquer $\Delta F/F$ en remplaçant par zéro les valeurs inférieures à $3\sigma_{bruit}$ (figure 3.27-D). C'est réducteur au sens où de l'activité pourrait se cacher sous cette barre, mais la suite du traitement étant basée sur des calculs de corrélation, nous sommes sûrs de mesurer les corrélations de l'activité, et non du bruit.

Comparaison avec la microscopie 2-photons

Nous pouvons maintenant comparer les signaux extraits des images issues du microscope à nappe laser utilisé à 20 Hz avec ceux extraits d'images issues d'un microscope biphoton conventionnel.

Nous avons recueilli des données typiques du laboratoire de German Sumbre, acquises en 2-photons à 4 Hz pour 256×256 pixels, dans le toit optique d'une larve semblable à celles que nous utilisons. L'analyse des signaux $\Delta F/F$ montre des amplitudes supérieures (0,5 en moyenne contre 0,1 avec la nappe laser) mais des niveaux de bruits σ_{bruit} très supérieurs (13 % contre 1 %). Nous avons donc tracé les distributions du signal normalisé par le bruit, $\frac{\Delta F/F}{\sigma_{bruit}}$, figure 3.28, et il apparaît que le rapport signal sur bruit est bien meilleur avec le microscope en nappe laser.

Le fort bruit enregistré par le microscope 2-photons s'explique par le peu de photons captés par pixels, rançon du peu de temps passé à les recueillir, dans le but de maximiser la fréquence d'enregistrement. Quant au microscope à nappe laser, s'il enregistre beaucoup plus de photons, son sectionnement optique moins bon et sa

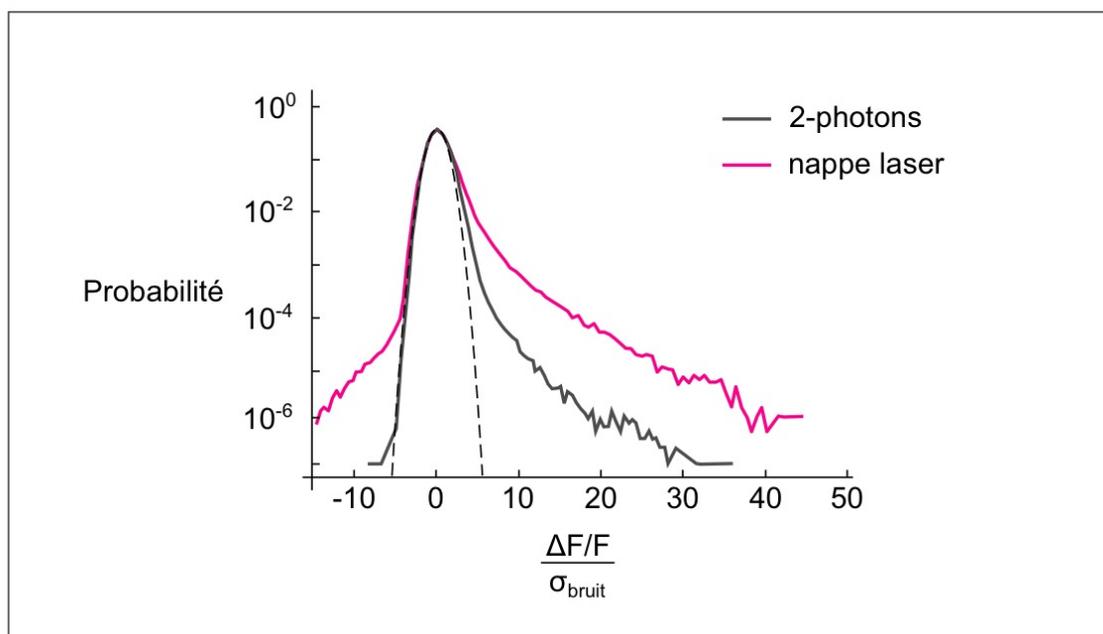


FIGURE 3.28 – Comparaison des distributions de probabilité des signaux normalisés par le bruit pour des enregistrements 2-photons et nappe laser.

prise d'image plein champ font qu'une part de ces photons proviennent du voisinage du point imagé par le pixel, ce qui augmente artificiellement le signal F et fait baisser $\Delta F/F$. Au total, l'avantage va quand même au microscope à nappe laser, même si la variabilité de l'activité spontanée d'un spécimen à l'autre nous empêche de le quantifier précisément.

3.4.3 Analyse des corrélations et clusterisation

Les résultats de cette section ont été obtenus en collaboration avec Sebastián Romano, de l'équipe de Germán Sumbre.

Après ce traitement, nous disposons de plus de 5000 traces $\Delta F/F$ correspondant à l'activité spontanée sur une tranche du cerveau de la larve, voire plus de 25 000 dans le cas d'un enregistrements 3D sur cinq couches. En l'absence de stimulation sensorielle, nous ne cherchons pas une réponse particulière et sommes intéressés par tout ce que ces jeux de données ont à nous apprendre sur la structure de connectivité

sous-jacente du réseau.

Devant la complexité de l'activité cérébrale, nous avons d'abord cherché à identifier les sous-réseaux en repérant les groupes de neurones présentant une activité cohérente. Une approche globale et sans a priori qui permet de tirer le meilleur parti du large champ offert par le microscope à nappe laser.

On calcule donc la corrélation par paire de toutes les traces $\Delta F/F$ tronquées, ce que l'on peut représenter par la matrice de la figure 3.29.

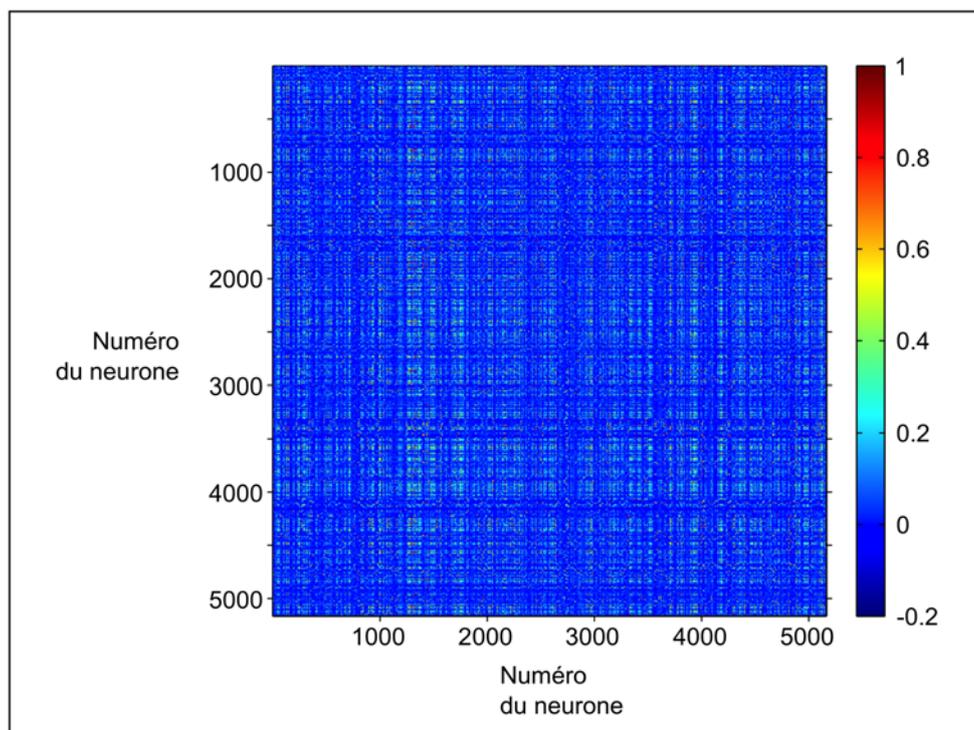


FIGURE 3.29 – Matrice des corrélations entre paires de neurones.

L'étape suivante est de former des groupes de neurones dont les membres sont fortement corrélés entre eux, et peu corrélés avec les neurones non-membres. Nous avons choisi d'utiliser pour cela l'algorithme de clusterisation *k-mean*, un procédé itératif auquel on doit préciser le nombre de groupes (clusters) à trouver.

Algorithme *k-mean*

Le jeu de données est considéré comme un nuage de points, et le but est de minimiser la distance entre les points et les centres des clusters auxquels ils sont attribués. Au commencement, les N centres sont choisis au hasard, puis l'on itère la boucle suivante :

- Attribuer chaque point au cluster du centre dont il est le plus proche
- Attribuer à chaque cluster un nouveau centre : la moyenne de tous ses points constitutifs

On arrête le processus lorsqu'il a convergé et que les nouveaux centres sont identiques aux précédents.

Ici la distance utilisée est un moins la corrélation. L'algorithme converge vers un minimum local, fonction des centres initiaux, qui peut donc ne pas être optimum. Pour maximiser les chances de trouver le minimum global, nous lançons 100 fois l'algorithme avec des centres initiaux aléatoires, puis nous gardons la clusterisation la plus efficace. La figure 3.30 montre un réarrangement de la matrice figure 3.29 après clusterisation en 12 parties.

Le nombre $N = 12$ pour les parties est choisi *a posteriori*, en lançant l'algorithme pour différentes valeurs comprises entre 1 et 20 et en gardant la clusterisation la plus satisfaisante. Il est à noter que pour $10 < N < 20$, la clusterisation est relativement similaire pour les dix clusters principaux, ce qui indique la robustesse du processus pour ceux-ci.

3.4.4 Analyses des clusters

Les résultats de cette section ont profité du travail de Sébastien Wolf, alors en stage au Laboratoire Jean Perrin.

Une fois les clusters identifiés, nous pouvons les visualiser et nous intéresser à leur organisation détaillée. Nous avons testé, de manière exploratoire, différentes

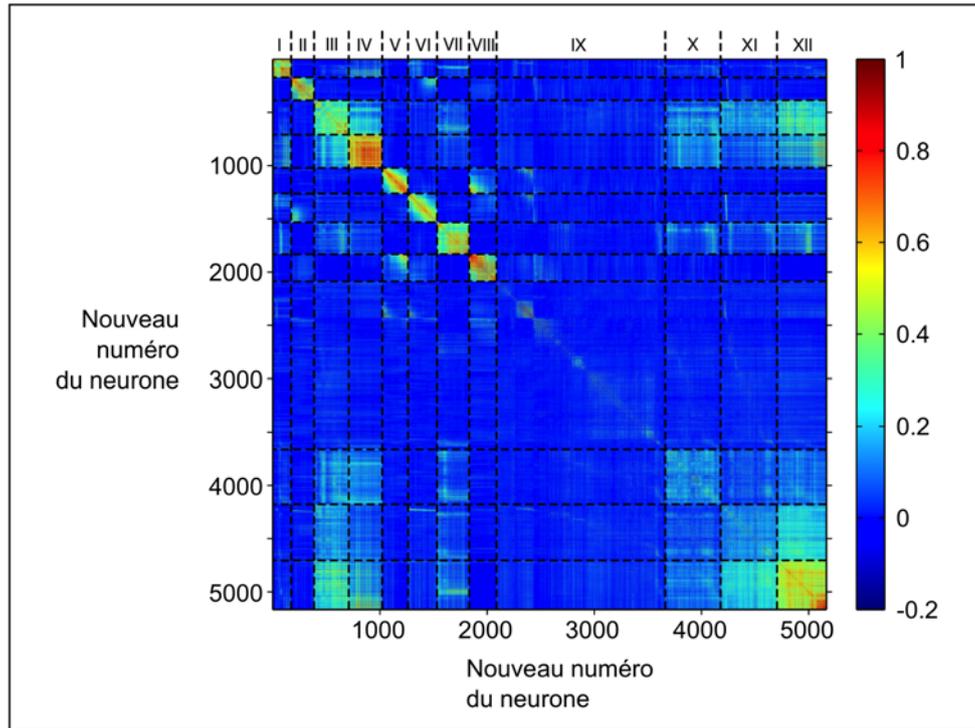


FIGURE 3.30 – Matrice réarrangée des corrélations entre paires de neurones, dans l'ordre des clusters.

méthodes d'analyse permettant de mettre en évidence des propriétés morphologiques et des organisations temporelles intra- et inter-clusters. Les résultats sont regroupés selon les zones du cerveau concernées.

Toit optique

La figure 3.31-A montre la cartographie d'un cluster caractéristique identifié dans le toit optique, une région connue pour traiter principalement l'information visuelle. On remarque que la corrélation diminue à mesure que l'on s'écarte d'un centre localisé à la frontière du neuropile, une morphologie qui se retrouve dans l'essentiel des clusters observés dans cette aire cérébrale. Pour caractériser plus précisément la structure intra-cluster de ces corrélations, nous avons utilisé un système de coordonnées pseudo-polaire qui repère les neurones par leur position angulaire le long d'arcs d'ellipse. En considérant un neurone particulier, la corrélation avec ses voisins de même bande elliptique (marqués en rouge dans la figure 3.31-C) diminue rapidement

avec la distance angulaire, alors qu'avec ses voisins de même bande radiale (marqués en jaune dans la figure 3.31-D), la corrélation reste constante et forte, pour ne chuter qu'une fois sur la séparation entre les parties droite et gauche du tectum. Ces résultats se retrouvent pour la plupart des neurones du toit optique.

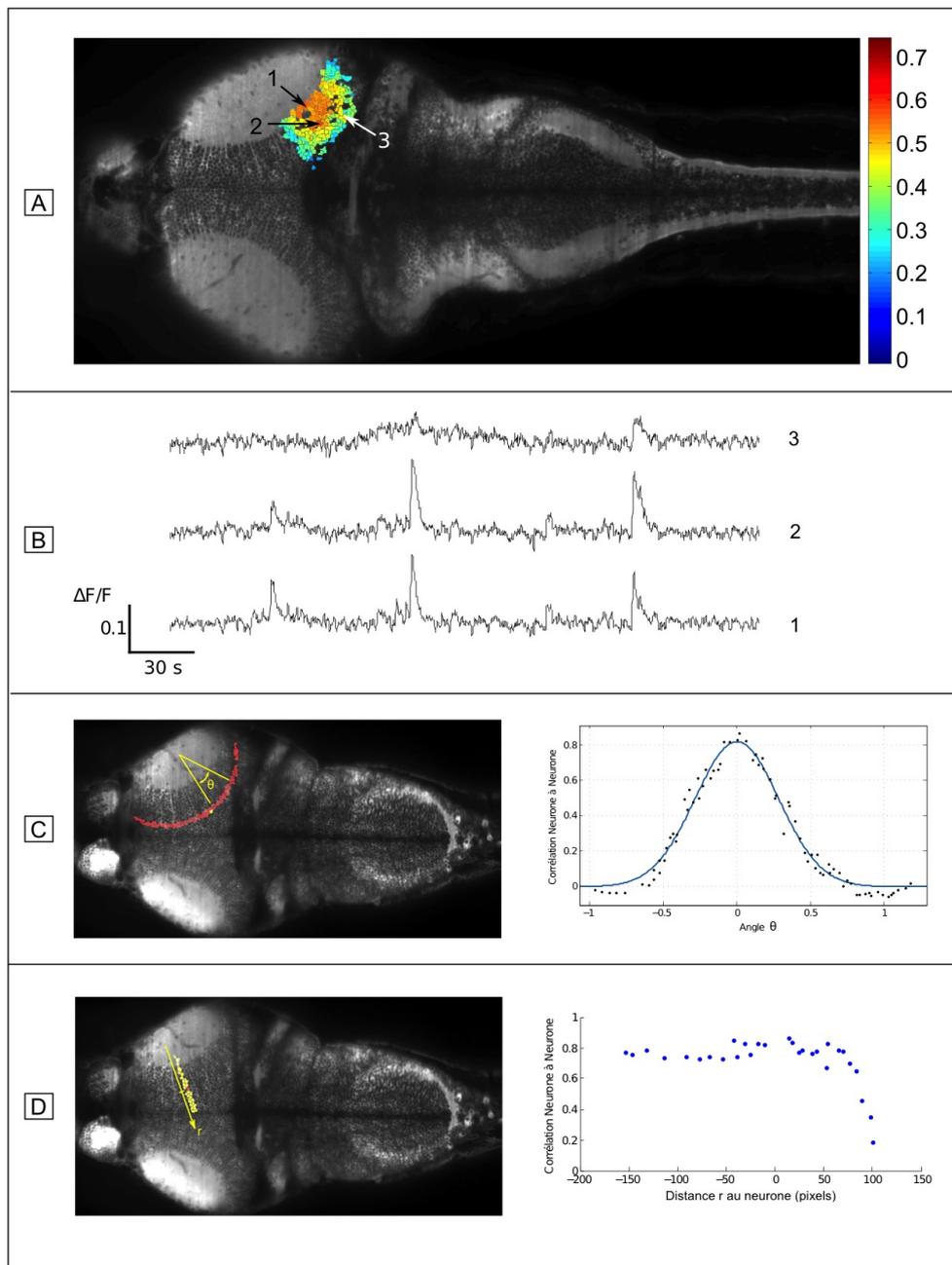


FIGURE 3.31 – Morphologie des clusters dans le toit optique.

A : neurones constitutifs du cluster numéroté II dans la figure 3.30 (en code couleur pour chaque neurone : moyenne des corrélations avec tous les autres neurones du cluster).

B : échantillons des signaux des trois neurones pointées sur l'image de gauche.

C, gauche : neurones appartenant à une même bande elliptique.

C, droite : corrélations entre le neurone jaune et les neurones rouges en fonction de leur écart angulaire.

D, gauche : neurones appartenant à une même bande radiale.

D, droite : corrélations entre le neurone rouge et les neurones jaunes en fonction de la distance entre eux.

Zones gustatives

La figure 3.32-A donne la cartographie des corrélations au sein du cluster VII de la figure 3.30. La majorité des neurones impliqués est située dans la zone de traitement primaire de l'information gustative. Les neurones restants sont séparés et localisés dans deux centres symétriquement disposés par rapport à l'axe central du poisson, que l'on pense être les noyaux gustatifs secondaires.

Nous avons voulu sonder l'organisation temporelle à l'intérieur de ce type de cluster, spatialement éclaté. La figure 3.32-B en présente un similaire, identifié sur une tranche d'un enregistrement 3D pris à 2 images par seconde. Quatre regroupements sont définis pour différencier les zones droites et gauches dans les zones primaire et secondaire. Pour chaque regroupement, un signal moyen est calculé à partir de tous les neurones le constituant. On calcule alors la corrélation temporelle entre ces signaux moyennés pour différents décalages temporels. Il apparaît alors que le maximum de corrélation est obtenu pour un retard de 500 ms du signal de la partie bleue (ou verte) sur le signal de la partie rouge (ou jaune). Les parties bleue et verte ont donc tendance à s'activer en avance par rapport aux zones rouge et jaune.

Ce type d'analyse profiterait d'une fréquence d'acquisition plus élevée, mais on note que même avec une résolution temporelle faible (500 ms), la longue durée de l'enregistrement permet de dégager des résultats statistiquement pertinents.

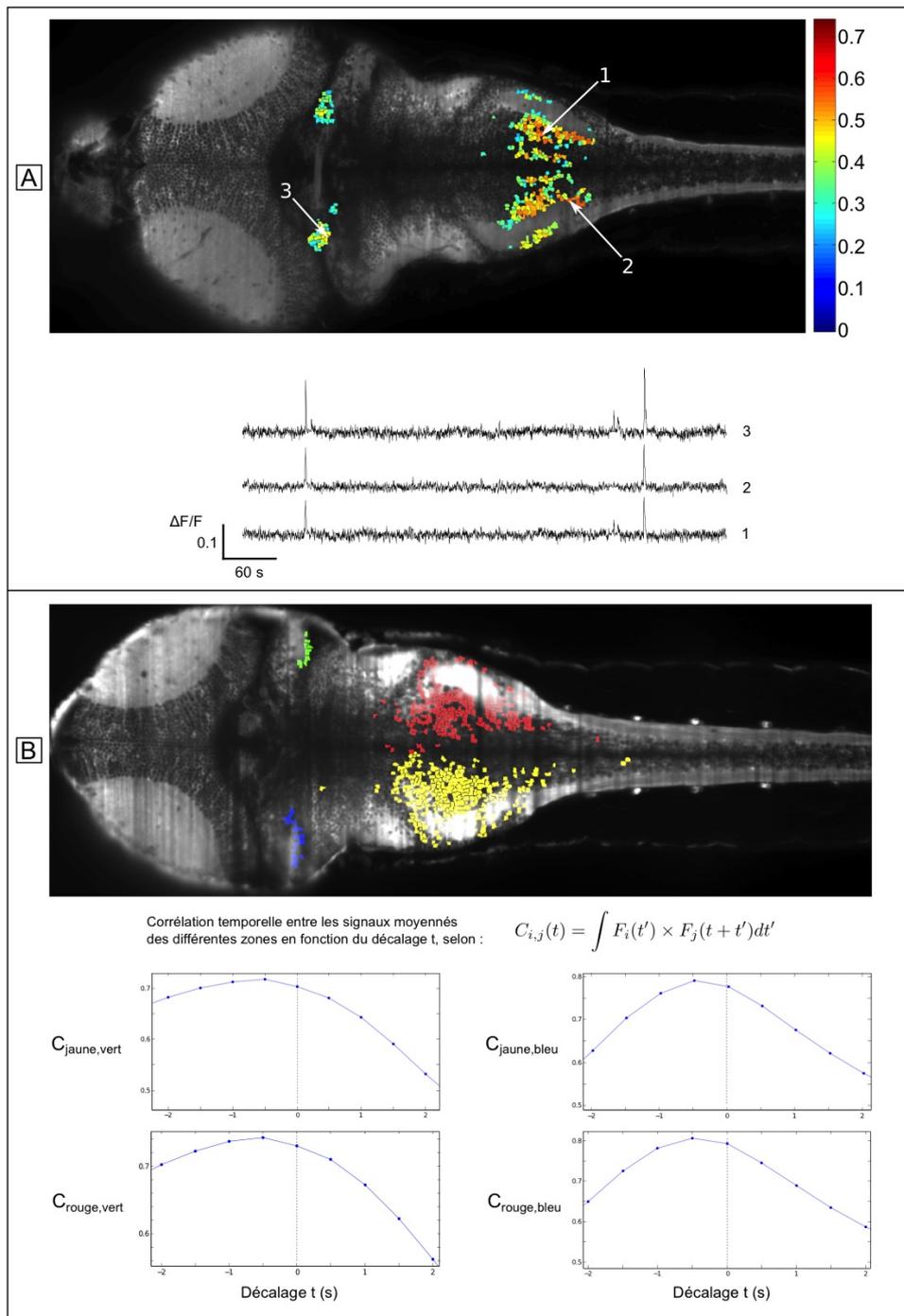


FIGURE 3.32 – Clusters associés au système gustatif et analyse temporelle.
 A : neurones constitutifs du cluster numéroté VII dans la figure 3.30 (en code couleur pour chaque neurone : moyenne des corrélations avec tous les autres neurones du cluster) et échantillons des signaux des trois neurones pointées sur l'image.
 B, séparation en quatre zones d'un cluster similaire et corrélation temporelle entre les signaux moyens en fonction du décalage. Les zones verte et bleue s'activent avant les zones rouge et jaune.

Zones motrices

La figure 3.33-A montre les éléments du cluster IV de la figure 3.30, qui sont situés surtout dans la moelle épinière. Leurs bouffées d'activité régulières, de 5 s de période typique, peuvent être associées à de l'activité motrice (fictive, le poisson étant paralysé). En plus des neurones de la moelle épinière, on trouve dans ce cluster deux noyaux isolés dans le rhombencéphale, symétriques par rapport au plan médian du poisson, et qui pourraient correspondre aux noyaux octavo-latéraux intermédiaires.

La figure 3.33-B montre le détail des signaux moyennés de ces deux noyaux, obtenus dans un autre échantillon. La trace rouge (respectivement bleue) correspond au signal moyen des neurones indiqués en rouge (respectivement bleu). On note la régularité de l'activité et la forte corrélation entre les signaux, sans que leurs amplitudes de variations soient exactement semblables.

La figure 3.33-C montre que l'on a identifié une population éparsée de neurones dont l'activité est très exactement anti-corrélée avec celle du cluster comprenant la moelle épinière. Les moments d'activité du groupe bleu ne surviennent qu'aux moments de silence du groupe vert (signaux moyennés sur les clusters).

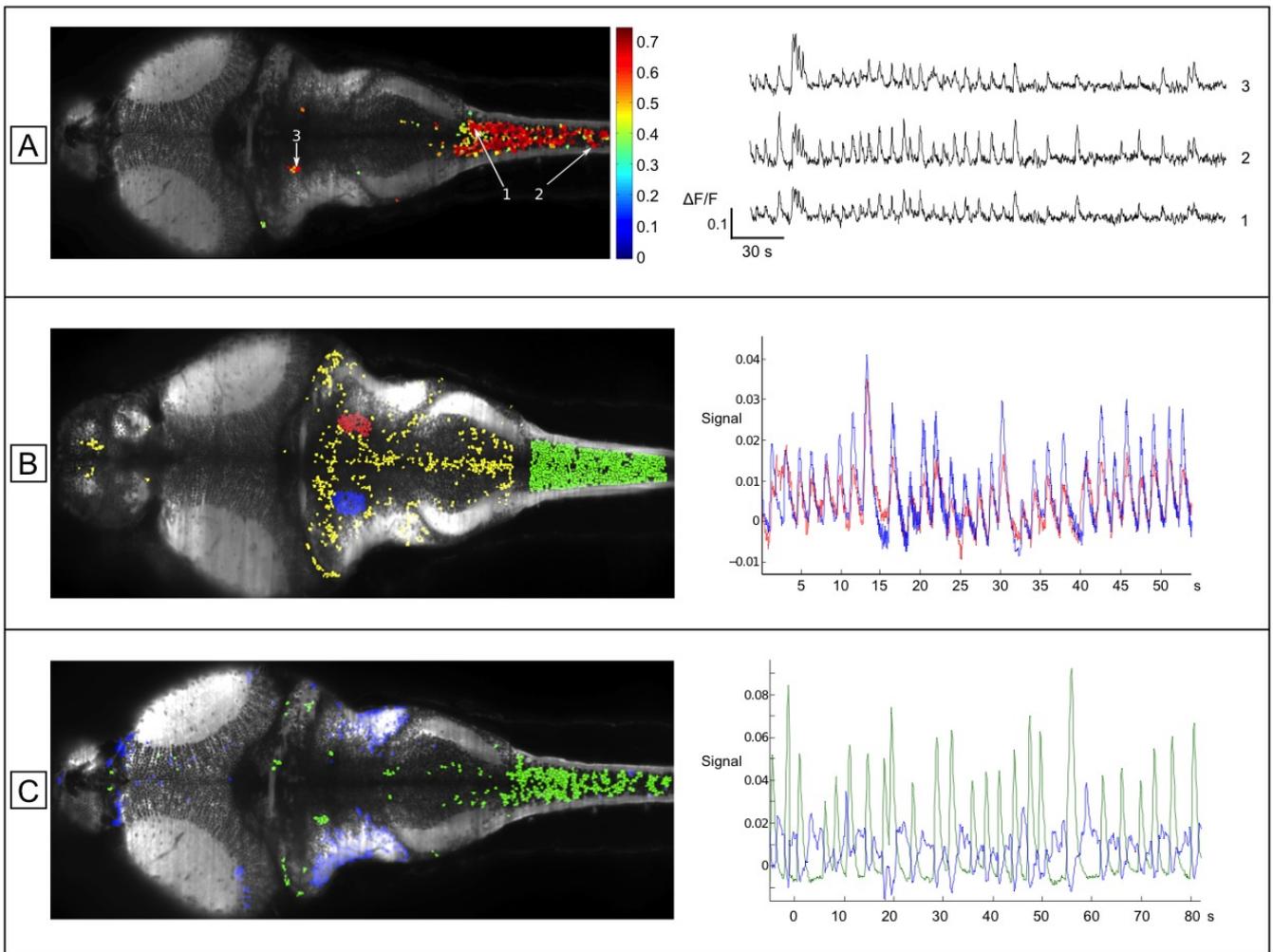


FIGURE 3.33 – Clusters de zones motrices, corrélations et anti-corrélations.

A : neurones constitutifs du cluster numéroté IV dans la figure 3.30 (en code couleur pour chaque neurone : moyenne des corrélations avec tous les autres neurones du cluster) et échantillons des signaux des trois neurones pointées sur l'image.

B, corrélation des signaux moyens des deux noyaux octavo-latéraux intermédiaires (en rouge et en bleu) symétriques par rapport à l'axe principal du poisson.

C, anti-corrélation des signaux moyens du cluster de la moelle épinière et d'un cluster de neurones épars.

Rhombencéphale

Pour finir, la figure 3.34 montre deux groupes de neurones du rhombencéphale, situés de manière symétrique par rapport au plan médian de l'animal, dont les activités ne présentent pas de régularité particulière, mais qui sont systématiquement anti-corrélées. On remarque les échelles de temps beaucoup plus longues : sans que l'on puisse parler de période, l'intervalle typique d'activité de l'un ou l'autre des groupes est de l'ordre de la dizaine de seconde, parfois bien plus.

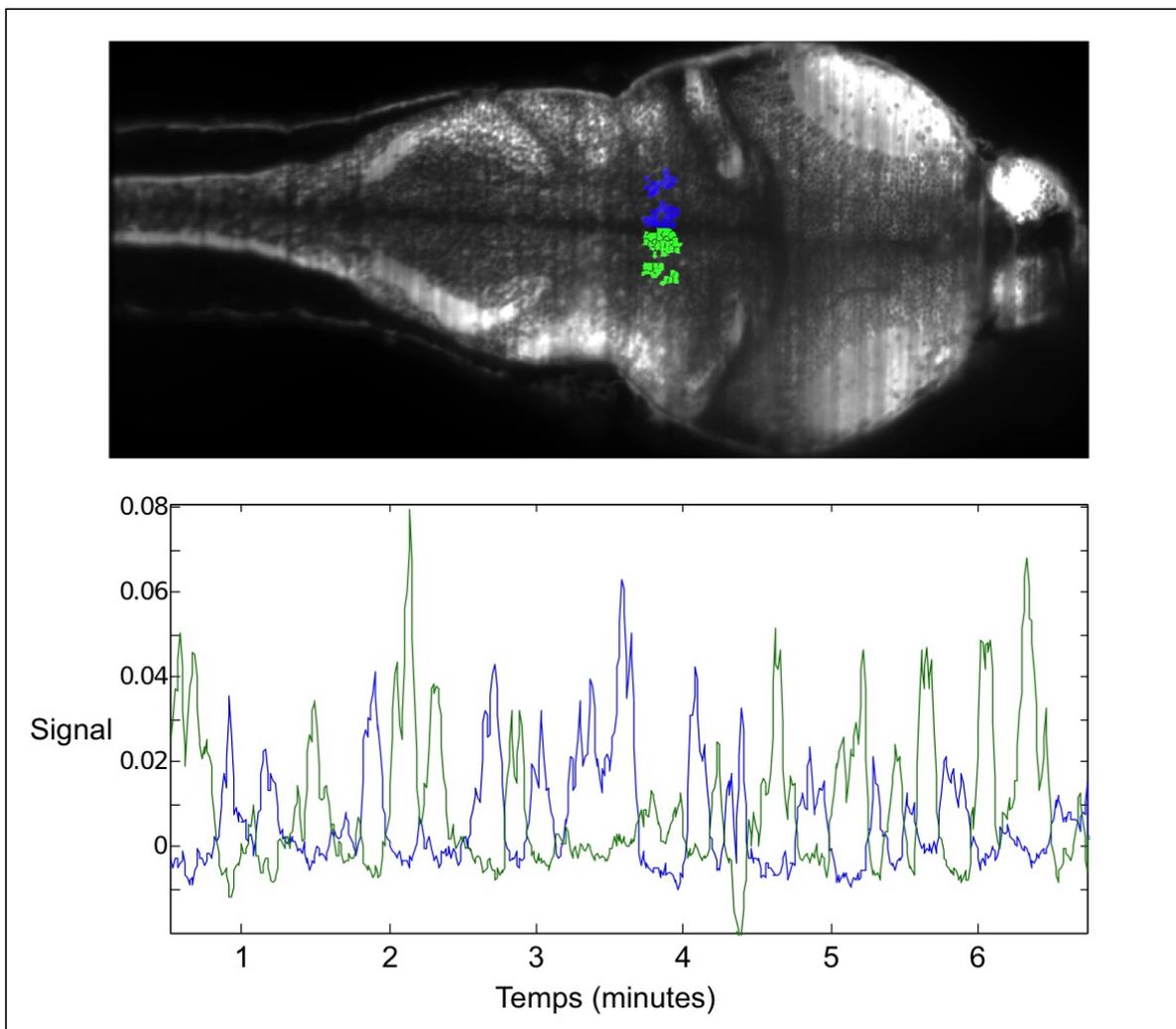


FIGURE 3.34 – Activité totalement anti-corrélée de deux zones symétriques du rhombencéphale.

3.5 Conclusion

Le montage développé durant ma thèse se révèle être un microscope simple à utiliser et fonctionnel. La préparation, la mise en place du spécimen et sa prévisualisation sont l'affaire de quelques minutes. L'automatisation du traitement des images et de l'extraction des signaux représente une économie de temps considérable pour l'opérateur. En effet, en augmentant la taille de la zone enregistrée, la fréquence d'acquisition et la durée des enregistrements, on augmente fortement la quantité de données à traiter à la suite de chaque expérience. Dès lors, il devient rentable de prendre le temps de développer un processus automatisé permettant de se passer d'un détournage manuel des neurones.

Le haut débit de données, augmenté par rapport à ceux des techniques classiques de microscopie, peut être mis à profit pour agrandir la zone imagée, tout en conservant une fréquence d'acquisition suffisante pour détecter les bouffées d'activité. La fluorescence de GCaMP3 a un temps typique de descente de 650 ms : une fréquence de quatre images par seconde permet donc de la visualiser. À cette fréquence, le montage est capable d'enregistrer cinq plans différents dans le cerveau, soit plus de 25 000 neurones (30 % du nombre total pour la larve) distribués dans l'ensemble du cerveau. À titre de comparaison, en 2012 Ahrens *et al.* [54] proposent l'identification de réseaux neuronaux répartis sur plusieurs parties du cerveau d'une larve de poisson-zèbre. Cependant le champ de vision de leur montage traditionnel à deux photons ne mesure que $225 \times 100 \mu\text{m}$, ils sont donc dans l'obligation de fusionner plusieurs enregistrements effectués en différents endroits du cerveau pour reconstruire une mosaïque couvrant le cerveau complet. Pour chacun de ces enregistrements, la stimulation est identique, ainsi les auteurs peuvent identifier l'ensemble des neurones recrutés lors d'une stimulation. Mais ils ne peuvent pas voir la variabilité de la réponse d'une stimulation à la suivante, ni une possible adaptation du réseau à la répétition d'une même stimulation. La taille du champ accessible simultanément est donc un atout majeur du montage de microscopie par nappe laser.

Par ailleurs, Johansson et Birznieks [55] ont montré qu'après une stimulation tactile chez l'homme, l'ordre dans lequel arrivent les potentiels d'action des différents afférents du système sensoriel contient de l'information sur le stimulus. Il semble donc utile de pouvoir augmenter la fréquence d'acquisition des images pour enregistrer de tels détails temporels. C'est possible en restreignant le nombre de neurones suivis : on peut par exemple se limiter à un seul plan dans le cerveau, et enregistrer 5000 neurones à 20 Hz.

Pour aller plus loin, on gagnerait à utiliser un rapporteur à court temps de montée de fluorescence : dans un signal bruité, une montée plus rapide du signal permet une meilleure précision sur l'instant de déclenchement.

D'autre part, une bonne résolution temporelle permet de distinguer une grosse bouffée d'activité d'une succession rapide de bouffées plus petites, celles-ci donnant alors un signal en dents de scie. Pour pouvoir faire la distinction, la fréquence d'arrivée des bouffées ne doit pas dépasser l'inverse du temps de descente de la fluorescence du rapporteur, d'où l'intérêt de faire diminuer ce dernier.

Enfin, le montage peut prendre les images à des fréquences supérieures à 20 Hz, au prix d'un temps d'exposition diminué, donc un nombre de photons collectés inférieur et une baisse du rapport signal sur bruit. Pour profiter pleinement du haut débit de données, il faudrait donc utiliser un rapporteur avec une meilleure brillance, pour pouvoir collecter autant de photons en un temps plus court.

Ces trois axes de développement : réduire le temps de montée, réduire le temps de descente et augmenter la brillance du rapporteur, sont précisément ceux qui ont été suivis pour le développement du GCaMP6 [48]. Les performances du montage en termes de résolution temporelles seront donc directement améliorées par l'utilisation des nouvelles versions des rapporteurs calciques.

Une autre perspective, majeure, pour ce travail est de ne plus se contenter de l'activité spontanée et de rajouter un étage de stimulation contrôlée. Les modalités sensorielles envisagées sont d'abord la perception des flux hydrodynamiques et la

perception gustative, qui nécessitent le développement d'outils microfluidiques pour la stimulation. La stimulation visuelle est aussi prévue et justifie qu'une version biphoton du microscope à nappe laser soit à l'étude. En effet, le laser infrarouge d'excitation est invisible pour le poisson, qui peut réagir aux autres stimuli visuels qu'on lui propose, alors qu'il est ébloui par le laser bleu actuellement utilisé. Le microscope à nappe laser biphoton a déjà donné de bons résultats en imagerie structurale [56]. On peut aussi envisager un contrôle encore plus direct sur l'activité cérébrale en tirant profit des progrès de l'optogénétique [57]. Il s'agit de faire exprimer à certains neurones des protéines transmembranaires sensibles à la lumière. Ainsi, en éclairant sélectivement les neurones ciblés avec la bonne longueur d'onde, on peut forcer leur activation ou au contraire inhiber leur activité, et en étudier l'impact sur le reste du système nerveux.

L'autre pan du développement à venir concerne le traitement des données, que l'on cherche à optimiser pour les enregistrements 3D qui suivent plusieurs dizaines de milliers de neurones. En effet, les calculs de corrélations par paires augmentent comme le carré du nombre d'éléments, ce qui devient un problème dans le cas des très grands nombres de neurones suivis. Dans un premier temps, il est commode de réduire la dimensionnalité du problème en regroupant les neurones fortement corrélés en super-neurones et de travailler avec les signaux moyennés.

D'autre part, pour résoudre le problème d'inversion (déduire la carte de connectivité des neurones à partir de leurs corrélations), la méthode d'analyse des corrélations et les regroupements en sous-réseaux seront aussi à raffiner, en particulier pour autoriser les neurones à appartenir à plus d'un regroupement.

Ainsi amélioré des points de vue technique et logiciel, il est certain que le montage commencera à donner des réponses nouvelles à propos du fonctionnement du système nerveux du poisson-zèbre.

Bibliographie

- [1] J Scheibert, S Leurent, A Prevost, and G Debregeas. The role of fingerprints in the coding of tactile information probed with a biomimetic sensor. *Science*, 323(5920) :1503–1506, 2009.
- [2] Roland S Johansson. Tactile sensibility in the human hand : receptive field characteristics of mechanoreceptive units in the glabrous skin area. *The Journal of Physiology*, 1978.
- [3] Roland S Johansson. Skin mechanoreceptors in the human hand receptive field characteristics. *Sensory functions of the skin*, 1976.
- [4] JR Phillips and Kenneth O Johnson. Tactile spatial resolution. III. A continuum mechanics model of skin predicting mechanoreceptor responses to bars, edges, and gratings. *Journal of Neurophysiology*, 1981.
- [5] S S Kim, A P Sripathi, and Sliman J Bensmaia. Predicting the Timing of Spikes Evoked by Tactile Stimulation of the Hand. *Journal of Neurophysiology*, 104(3) :1484–1496, September 2010.
- [6] Kenneth O Johnson. Neural mechanisms of spatial tactile discrimination : neural patterns evoked by braille-like dot patterns in the monkey. *The Journal of Physiology*, 1981.
- [7] JJ DiCarlo, Kenneth O Johnson, and SS Hsiao. Structure of receptive fields in area 3b of primary somatosensory cortex in the alert monkey. *Journal of Neuroscience*, 18(7) :2626, 1998.

- [8] A B Vallbo and Roland S Johansson. Skin mechanoreceptors in the human hand : neural and psychophysical thresholds. *Sensory functions of the skin in primates*, pages 185–99, 1976.
- [9] A B Vallbo, H Olausson, J Wessberg, and N Kakuda. Receptive field characteristics of tactile units with myelinated afferents in hairy skin of human subjects. *The Journal of Physiology*, 483(Pt 3) :783, 1995.
- [10] JR Phillips and Kenneth O Johnson. Tactile spatial resolution. I. Two-point discrimination, gap detection, grating resolution, and letter recognition. *Journal of Neurophysiology*, 1981.
- [11] JR Phillips and Kenneth O Johnson. Tactile spatial resolution. II. Neural representation of bars, edges, and gratings in monkey primary afferents. *Journal of Neurophysiology*, 1981.
- [12] JR Phillips, Roland S Johansson, and Kenneth O Johnson. Responses of human mechanoreceptive afferents to embossed dot arrays scanned across fingerpad skin. *The Journal of Neuroscience*, 12(3) :827, 1992.
- [13] Marco Piccolino. Animal electricity and the birth of electrophysiology : the legacy of Luigi Galvani. *Brain research bulletin*, 46(5) :381–407, 1998.
- [14] Kenneth O Johnson. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4) :455–461, 2001.
- [15] JH Killebrew, Sliman J Bensmaia, JF Dammann, P Denchev, SS Hsiao, JC Craig, and Kenneth O Johnson. A dense array stimulator to generate arbitrary spatio-temporal tactile stimuli. *Journal of neuroscience methods*, 161(1) :62–74, 2007.
- [16] A B Vallbo and K E Hagbarth. Activity from skin mechanoreceptors recorded percutaneously in awake human subjects. *Experimental Neurology*, 21(3) :270–289, July 1968.

- [17] D H Hubel. Tungsten Microelectrode for Recording from Single Units. *Science*, 125(3247) :549–550, March 1957.
- [18] S C Gandevia and J P Hales. The methodology and scope of human microneurography. *Journal of neuroscience methods*, 74(2) :123–136, 1997.
- [19] A Paul Alivisatos, Miyoung Chun, George M Church, Ralph J Greenspan, Michael L Roukes, and Rafael Yuste. The Brain Activity Map Project and the Challenge of Functional Connectomics. *Neuron*, 74(6) :970–974, June 2012.
- [20] J W Lichtman and Winfried Denk. The Big and the Small : Challenges of Imaging the Brain’s Circuits. *Science*, 334(6056) :618–623, November 2011.
- [21] György Buzsáki. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 7(5) :446–451, May 2004.
- [22] Bradley J Baker, Efstratios K Kosmidis, Dejan Vucinic, Chun X Falk, Lawrence B Cohen, Maja Djurasic, and Dejan Zecevic. Imaging Brain Activity With Voltage- and Calcium-Sensitive Dyes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2) :245–282, April 2005.
- [23] L L Looger and O Griesbeck. Genetically encoded neural activity indicators. *Current Opinion in Neurobiology*, 2012.
- [24] Joel M Kralj, Adam D Douglass, Daniel R Hochbaum, Dougal Maclaurin, and Adam E Cohen. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature Methods*, 9(1) :90–95, November 2011.
- [25] Werner Göbel and Fritjof Helmchen. In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology*, 22(6) :358–365, 2007.
- [26] Benjamin F Grewe, Dominik Langer, Hansjörg Kasper, Björn M Kampa, and Fritjof Helmchen. High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision. *Nature Methods*, 7(6) :479–479, June 2010.
- [27] C Grienberger and A Konnerth. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 2012.

- [28] C C ASHLEY and E B RIDGWAY. Simultaneous Recording of Membrane Potential, Calcium Transient and Tension in Single Muscle Fibres. *Nature*, 219(5159) :1168–1169, September 1968.
- [29] F Helmchen, K Imoto, and B Sakmann. Ca²⁺ buffering and action potential-evoked Ca²⁺ signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophysical Journal*, 1996.
- [30] Michael J Berridge, Peter Lipp, and Martin D Bootman. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1) :11–21, October 2000.
- [31] J M Kralj, D R Hochbaum, A D Douglass, and A E Cohen. Electrical Spiking in Escherichia coli Probed with a Fluorescent Voltage-Indicating Protein. *Science*, 333(6040) :345–348, July 2011.
- [32] Thomas Knöpfel. Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10) :687–700, August 2012.
- [33] José-Angel Conchello and Jeff W Lichtman. Optical sectioning microscopy. *Nature Methods*, 2(12) :920–931, December 2005.
- [34] Winfried Denk, James H Strickler, and Watt W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [35] Jason N D Kerr and Winfried Denk. Imaging in vivo : watching the brain in action. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3) :195–205, 2008.
- [36] Jörg Bewersdorf, Rainer Pick, and Stefan W Hell. Multifocal multiphoton microscopy. *Optics letters*, 23(9) :655–657, 1998.
- [37] R Salomé, Y Kremer, S Dieudonné, J F Léger, O Krichevsky, C Wyart, D Charney, and L Bourdieu. Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors. *Journal of neuroscience methods*, 154(1-2) :161–174, June 2006.

- [38] Jerome C Mertz. *Introduction to Optical Microscopy*. Roberts and Company Publishers, 2010.
- [39] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.
- [40] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science*, 322(5904) :1065–1069, 2008.
- [41] Terrence F Holekamp, Diwakar Turaga, and Timothy E Holy. Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy. *Neuron*, 57(5) :661–672, March 2008.
- [42] Jerome C Mertz. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nature Publishing Group*, 8(10) :811–819, October 2011.
- [43] Silke Rinkwitz, Philippe Murrain, and Thomas S Becker. Zebrafish : An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 93(2) :231–243, February 2011.
- [44] Florian Engert and Steve Wilson. Zebrafish neurobiology : From development to circuit function and behaviour. *Developmental Neurobiology*, 72(3) :215–217, February 2012.
- [45] Rainer W Friedrich, Gilad A Jacobson, and Peixin Zhu. Circuit Neuroscience in Zebrafish. *Current Biology*, 20(8) :R371–R381, April 2010.
- [46] Junichi Nakai, Masamichi Ohkura, and Keiji Imoto. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. 19(2) :137–141, February 2001.
- [47] Lin Tian, S Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M Eugenia Chiappe, Sreekanth H Chalasani, Leopoldo Petreanu, Jasper Akerboom, Sean A McKin-

- ney, Eric R Schreiter, Cornelia I Bargmann, Vivek Jayaraman, Karel Svoboda, and Loren L Looger. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12) :875–881, November 2009.
- [48] Tsai-Wen Chen, Trevor J Wardill, Yi Sun, Stefan R Pulver, Sabine L Renninger, Amy Baohan, Eric R Schreiter, Rex A Kerr, Michael B Orger, Vivek Jayaraman, Loren L Looger, Karel Svoboda, and Douglas S Kim. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458) :295–300, July 2013.
- [49] Claire Wyart, Filippo Del Bene, Erica Warp, Ethan K Scott, Dirk Trauner, Herwig Baier, and Ehud Y Isacoff. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature*, 461(7262) :407–410, September 2009.
- [50] John H McLeod. The axicon : a new type of optical element. *JOSA*, 44(8) :592–592, 1954.
- [51] John H McLeod. Axicons and their uses. *JOSA*, 50(2) :166–166, 1960.
- [52] R Arimoto, C Saloma, T Tanaka, and S Kawata. Imaging properties of axicon in a scanning optical system. *Applied optics*, 31(31) :6653–6657, 1992.
- [53] T Planchon, L Gao, D Milkie, and M Davidson. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nature Methods*, 2011.
- [54] Misha B Ahrens, Jennifer M Li, Michael B Orger, Drew N Robson, Alexander F Schier, Florian Engert, and Ruben Portugues. Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish. *Nature*, 485(7399) :471–477, May 2012.
- [55] Roland S Johansson and I Birznieks. First spikes in ensembles of human tactile afferents code complex spatial fingertip events. *Nature Neuroscience*, 7(2) :170–177, 2004.

- [56] Thai V Truong, Willy Supatto, David S Koos, John M Choi, and Scott E Fraser. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 8(9) :757–760, July 2011.
- [57] O Yizhar, L E Fenno, T J Davidson, and M Mogri. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*, 2011.

Annexe : Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy



Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy

Thomas Panier¹, Sebastián A. Romano^{2,3,4}, Raphaël Olive¹, Thomas Pietri^{2,3,4}, Germán Sumbre^{2,3,4}, Raphaël Candelier¹ and Georges Debrégeas^{1*}

¹ CNRS/UPMC Laboratoire Jean Perrin, Université Paris 6, Paris, France

² Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, France

³ Inserm, U1024, Paris, France

⁴ CNRS, UMR 8197, Paris, France

Edited by:

Gonzalo G. De Polavieja, Instituto Cajal. CSIC, Spain

Reviewed by:

Rainer W. Friedrich, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Switzerland

Johann Bollmann, Max Planck Institute for Medical Research, Germany

*Correspondence:

Georges Debrégeas, CNRS/UPMC Laboratoire Jean Perrin, Université Paris 6, FRE 3231, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.
e-mail: georges.debregeas@upmc.fr

The optical transparency and the small dimensions of zebrafish at the larval stage make it a vertebrate model of choice for brain-wide *in-vivo* functional imaging. However, current point-scanning imaging techniques, such as two-photon or confocal microscopy, impose a strong limit on acquisition speed which in turn sets the number of neurons that can be simultaneously recorded. At 5 Hz, this number is of the order of one thousand, i.e., approximately 1–2% of the brain. Here we demonstrate that this limitation can be greatly overcome by using Selective-plane Illumination Microscopy (SPIM). Zebrafish larvae expressing the genetically encoded calcium indicator GCaMP3 were illuminated with a scanned laser sheet and imaged with a camera whose optical axis was oriented orthogonally to the illumination plane. This optical sectioning approach was shown to permit functional imaging of a very large fraction of the brain volume of 5–9-day-old larvae with single- or near single-cell resolution. The spontaneous activity of up to 5,000 neurons was recorded at 20 Hz for 20–60 min. By rapidly scanning the specimen in the axial direction, the activity of 25,000 individual neurons from 5 different z-planes (approximately 30% of the entire brain) could be simultaneously monitored at 4 Hz. Compared to point-scanning techniques, this imaging strategy thus yields a ≈ 20 -fold increase in data throughput (number of recorded neurons times acquisition rate) without compromising the signal-to-noise ratio (SNR). The extended field of view offered by the SPIM method allowed us to directly identify large scale ensembles of neurons, spanning several brain regions, that displayed correlated activity and were thus likely to participate in common neural processes. The benefits and limitations of SPIM for functional imaging in zebrafish as well as future developments are briefly discussed.

Keywords: zebrafish model system, spontaneous activity, correlation analysis, neuroimaging, imaging, three-dimensional, light-sheet imaging

INTRODUCTION

Cognitive processes generally implicate extended neural networks spanning several areas of the brain. In order to shed light on the neural basis of these processes, it is thus necessary to simultaneously monitor the dynamics of multiple brain regions with single-cell resolution (Alivisatos et al., 2012). In striking contrast with this requirement, current experimental methods sample a small number of neurons located in a single brain area. Silicon-based nanoprobe allow electrophysiologists to simultaneously record up to a few hundred neurons (Du et al., 2011; Stevenson and Kording, 2011). Their future development is however limited by the intrinsically invasive nature of the technique. In the last two decades, functional imaging approaches, in which the neurons' spiking dynamics is monitored *via* the increase in fluorescence of calcium-binding reporters, have allowed to partially circumvent this limitation (Grienberger and Konnerth, 2012). Further assets of neuro-imaging, with respect to electrophysiology, include the accurate localization of the monitored neurons, the possibility

to distinguish cell identity using specific markers and the precise manipulation of neural activity using optogenetic methods (Wyart et al., 2009).

Imaging of three-dimensional fluorescent tissues requires optical sectioning, which is generally obtained by using confocal or two-photon microscopy (Denk et al., 1990; Yuste and Denk, 1995; Bollmann and Engert, 2009). These point-scanning microscopy (PSM) approaches in turn impose a drastic limit in recording speed: in order to collect a significant number of photons in a given voxel, a minimum laser dwelling time of the order of 1 μ s is needed (Holekamp et al., 2008). This yields a bound of roughly 10^6 voxels per second in acquisition rate, which, even with optimized scanning trajectories (Salomé et al., 2006; Lillis et al., 2008; Grewe et al., 2010; Katona et al., 2012), limits the number of neurons that can be dynamically recorded.

In recent years, selective-plane illumination microscopy (SPIM) has been rediscovered in the context of embryo development (Mertz, 2011; Tomer et al., 2011; Weber and Huisken, 2011)

and physiology (Huisken et al., 2004; Verveer et al., 2007; Keller and Dodt, 2012). In this imaging configuration, optical sectioning is performed through side-on illumination of the sample by a thin (micrometer-thick) laser sheet, whereas fluorescence photons are collected by a camera whose optical axis is orthogonal to the illumination plane. One of the significant assets of this approach, compared to PSM, lies in the fact that different regions in the focal plane are simultaneously illuminated and are thus exposed for a much longer time in average. As a result, the data throughput is in practice limited by the camera transfer rate, which is currently of the order of a few hundreds of Mpixels per second for highly sensitive sensors.

The strongest limitation of light-sheet microscopy compared to epifluorescence methods lies in the need to access the sample from two orthogonal axis. This is a severe constraint when dealing with large organs such as mammalian brain (Engelbrecht et al., 2010), which may explain why this method has not yet received a lot of attention from neurophysiologists. The only functional imaging experiments using SPIM that have been reported so far were performed on excised mice's vomeronasal organs (Holekamp et al., 2008; Turaga and Holy, 2012). Although the effective penetration depth was quite modest (of the order of 150 μm), this experiment did prove to produce simultaneous recordings of an unprecedented number of neurons with single-cell resolution.

Zebrafish is an ideal candidate for the use of SPIM-based *in vivo* functional imaging. At the larval stage, its brain is transparent and relatively small (typically $200 \times 500 \times 1000 \mu\text{m}$) which makes it fully amenable for PSM-based calcium imaging (Higashijima et al., 2003; Niell and Smith, 2005; Ramdya and Engert, 2008; Sumbre et al., 2008; McLean and Fetcho, 2009; Del Bene et al., 2010; Aizenberg and Schuman, 2011; Ahrens et al., 2012). Here we demonstrate that SPIM can be used as an alternative optical method for functional imaging in zebrafish, as it also provides single- or near single-cell resolution of a very large fraction of the brain volume of larvae aged 5–9 dpf. We show that this technique further yields a ≈ 20 -fold increase in acquisition speed (number of recorded neurons times acquisition rate) compared to point-scanning techniques without compromising the signal-to-noise ratio (SNR). We illustrate the potential of this approach by using the extended FOV provided by the SPIM technique to identify multiple brain regions exhibiting correlated spontaneous activity, and thus likely to participate in common neural processes. Since zebrafish larvae's brains are relatively small and compact (almost no extra-cellular space), we show that the *simultaneous* recording of the whole brain activity at several Hertz with single-cell resolution is within reach.

MATERIALS AND METHODS

GENERATION OF TRANSGENIC FISH

The tol2 HuC:GCaMP3 vector was built by successive ligations of a 3.2 kb fragment of the zebrafish HuC (elav3) promoter (gift from HC Park, Kyungpook National University, Korea. Park et al., 2000), then GCaMP3 calcium probe (gift from L. Looger, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, Virginia, USA Tian et al., 2012) into pT2KXIG in (from K. Kawakami, National Institute

of Genetics, Shizuoka, Japan). HuC promoter drives the expression of a RNA-binding protein and has been involved in neuronal differentiation. In zebrafish, the 3.2 kb proximal region encompassing 2771 base pairs of the 5'-upstream sequence up to the translation start site in +383/+385, has been shown to be sufficient to target specifically and efficiently all differentiated neurons (Park et al., 2000).

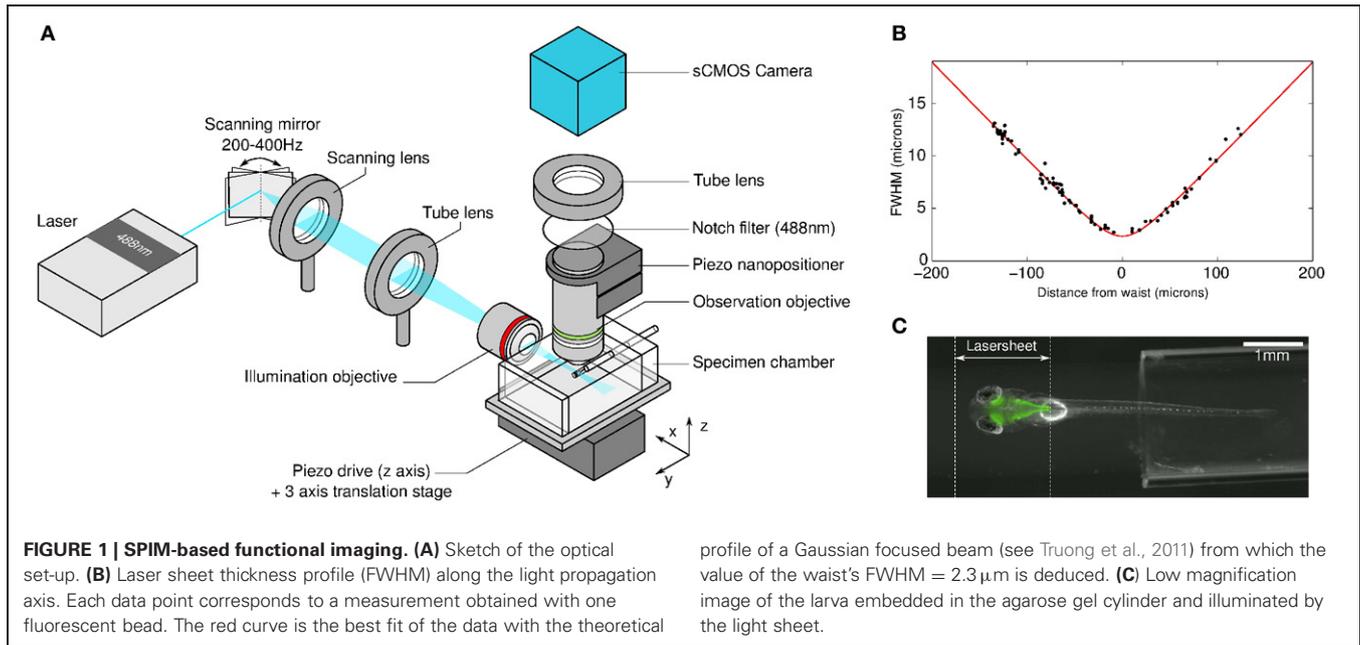
One cell stage Nacre zebrafish embryos (Lister et al., 1999) (*mitfa*^{-/-}) were injected with 20 ng of the plasmid DNA and 25 ng of transposase RNA (generated from pCS-TP plasmid, K. Kawakami). Injected embryos were raised to adulthood and crossed individually with Nacre fish to obtain F1 embryos. These embryos were then screened and selected according to their level of transgene expression. The embryos with the strongest expression were raised to adulthood and increased to obtain the homozygous HuC:GCaMP3^{G55} line. The HuC:GCaMP3^{G55} embryos were collected and raised at 28.5°C in E3 embryo medium. The larvae were kept under 14/10 h on/off light cycles and fed after 6 dpf. All experiments were approved by *Le Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale Charles Darwin* (Ce5/2009/027).

LARVAE PREPARATION

Zebrafish larvae aged 5–9 dpf were embedded in a low-melting-temperature agarose solution at a concentration of 1.8% in embryo medium. In order to minimize movement artifacts, the solution contained 0.3 mg/ml of Pancuronium bromide, a paralyzing agent. The fish was introduced into a glass capillary tube of internal diameter 1.5 mm. The tube was then inserted inside a PMMA square chamber filled with embryo medium and the fish was partially extruded using a piece of plastic tubing inserted in the capillary tube (**Figure 1C**). Both sides of the specimen chamber along the illumination path consisted of glass coverslips. The larva dorsoventral axis was aligned vertically by rotation of the agarose cylinder. The chamber was then positioned in the SPIM set-up on a 3-axis manual positioning stage. A piezo-positioner (piezosystem jena PZ 400 OEM) further allowed sub-micrometric vertical displacement of the chamber.

OPTICAL SET-UP

The light sheet was obtained by rapidly scanning a focused laser beam through the specimen (**Figure 1A**). A 488 nm Coherent Sapphire laser beam of power 2 mW and $1/e^2$ diameter of 0.7 mm was projected onto a galvanometric scanning mirror (Century Sunny TSH8203) driven sinusoidally at 200–400 Hz over an angular range of 9°. A scanning lens (30 mm focal length—Thorlabs AC254-030-A), placed in front of the scanning mirror, transformed the angular deflection into a horizontal displacement of the incident light. The beam was then refocused by a tube lens (200 mm focal length - Thorlabs AC508-200-A) onto the entrance pupil of a low-NA (0.16) 5x objective lens (Zeiss EC Plan-Neofluar) facing the specimen chamber. The association of the scanning and the tube lenses extended the beam to a diameter of 4.6 mm at the entrance of the illumination objective. This optical configuration yielded a 2 mm-wide illumination sheet. Its thickness profile was characterized by imaging 100 nm in diameter fluorescent beads embedded in an agarose gel cylinder as



they were scanned vertically across the laser sheet. The recorded intensity signal of each bead exhibited a Gaussian profile from which the local laser-sheet full width at half maximum (FWHM) was extracted. The sheet profile was found invariant along the scanning direction, as shown by the small dispersion obtained when plotting the measured FWHM values against the beads' distance to the waist (**Figure 1B**). The profile along the propagation axis was found consistent with that expected for a Gaussian beam.

The detection objective consisted of a high-NA (1.0) 20x water-immersion objective (Olympus XLUM-PLFLN) mounted vertically onto a piezo nanopositioner (piezosystem jena MIPOS 500), allowing precise adjustment of the focus plane with the light sheet. The fluorescence light was collected by a tube lens (150 mm focal length -Thorlabs AC254-150-A) and passed through a notch filter (Thorlabs NF488-15) in order to eliminate 488 nm photons. The image was then formed onto a sCMOS sensor (PCOedge). Full 16-bit images (2560×2160 pixels) could be recorded at a maximum rate of 100 Hz directly onto RAID-0 hard drives. The 20x magnification yielded a field of view of $1 \times 0.8\ \text{mm}^2$, with a pixel area of $0.4 \times 0.4\ \mu\text{m}^2$. In standard experiments, images were recorded at 10–20 Hz for 20–60 min and then converted into 16-bit TIFF files.

3D RECORDINGS

3D recordings were obtained by sequentially imaging 5 distinct z-planes separated by a distance of $8\ \mu\text{m}$ (total range of $32\ \mu\text{m}$). Every 50 ms, the specimen chamber was rapidly moved to a next position using the piezo-positioner. The sequence of the successive positions was interlaced in order to minimize the maximum step size and thus limit the acceleration imposed on the fish. The camera was asynchronously triggered 10 ms after each vertical displacement, and each frame was acquired for an exposure time of 40 ms. The 10 ms delay was necessary to allow for the agar

cylinder to come to rest and prevent vibration-induced blurring of the images. At the end of the run, the frames were sorted to produce 5 separate stacks corresponding to each z-plane. Each stack was analyzed independently using the same algorithm as in single z-plane recordings.

AUTOMATIC IMAGE SEGMENTATION

A segmentation routine written in Matlab was developed in order to automatically identify the regions of interest (ROIs) corresponding to individual somata and neuropil regions (the Matlab code is provided as a Supplementary Material). The brain contour was first manually outlined on the first image. A highly contrasted image was then obtained by time-averaging the complete images stack. Small XY drifts were corrected by registering each image of the stack with respect to the first one by extracting the displacement vector that provided the maximum correlation. The typical maximum excursion measured over an experimental run was of the order of a few microns. However small, if not corrected, this drift was found to significantly blur the time-averaged image and hamper the proper identification of individual somata. The drift displacement sequence was also used to identify periods of strong motor behaviors. As they induced significant artifacts in the fluorescence signals, the corresponding time-periods were eliminated from the analysis.

The segmentation procedure consisted of several steps. First, the image was smoothed by running a Gaussian filter with a width equal to half the typical soma diameter (5 pixels). Local contrast stretching was applied at the scale of individual neurons. A watershed algorithm was implemented on the resulting smoothed gray-scale image, returning a collection of adjacent regions associated with putative individual somata (regions of neuropil of similar area were also retained for further analysis). A few regions were then automatically eliminated based on morphological constraints (retained ROIs had a total area between

40 and 400 pixels and an equivalent ellipse eccentricity less than 0.85). The program allowed further visualization of the resulting segmentation and manual elimination of incorrectly identified neurons. Typically, a few tens of regions, essentially located at the border of the brain, were manually discarded. Given the large FOV offered by the visualization technique, up to 5,000 somata were typically imaged and their individual ROI automatically detected within a single z-plane. This segmentation procedure took approximately 1 h per 10,000 frames, with a few minutes of user time.

SIGNAL EXTRACTION AND BASELINE NOISE ESTIMATION

The fluorescence time signal $F(t)$ for each neuron was extracted by evaluating the mean intensity across the pixels within each ROI, in each motion-corrected image. After subtraction of the background, estimated from the average intensity of pixels outside the brain, a baseline fluorescence signal was estimated for each neuron by the running average of the 8th percentile of the raw data in sliding windows of 30 s length (Dombeck et al., 2007). The resulting smooth curve b_{slow} locally approximated the baseline level and reflected slow fluctuations unrelated to the fast calcium transients evoked by spiking activity. The relative variation of fluorescence intensity, dF/F , was calculated as $dF/F = (F(t) - b_{\text{slow}})/b_{\text{slow}}$.

The standard deviation σ_{noise} of each neuron's baseline fluctuations was extracted from the distribution of neuronal dF/F values. These distributions are skewed toward positive values reflecting the presence of activity-evoked positive transients in the fluorescence signal. In contrast, negative data points are unlikely to be related to neuronal firing. The standard deviation of the baseline noise was thus estimated by postulating that these negative fluctuations were part of a Gaussian stochastic process. Consistently, the corresponding region of the distribution could be accurately fitted with a Gaussian function ($r^2 = 0.997 \pm 0.002$ for a representative dataset) from which the standard deviation σ_{noise} was extracted for each neuron's fluorescence time-series.

2P-PSM EXPERIMENTS

In order to provide a comparison between SPIM and 2P-PSM approaches, neural recordings of spontaneous activity in the tectum were performed on similar GCaMP3-expressing larvae using a MOM-sutter system. Its main components consisted of a 25x NA1.05 Olympus objective and a Mai Tai DeepSee Ti:sapphire laser used at 920 nm with an output power of less than 3 mW after the objective. The filters consisted of a FF705 dichroic, a AFF01-680 short path (IR Blocker) and a FF01520/70 band-pass filter, all from Semrock. The PMT was a H1070 (GaAsP) from Hamamatsu. Images of 256 x 256 pixels were acquired at 4 Hz.

ANALYSIS OF NEURONAL ACTIVITY CORRELATIONS

For this analysis, we only considered fluorescence transients inferred to result from neuronal firing by imposing a threshold on each individual time-series. Any dF/F value below $3\sigma_{\text{noise}}$ was set to 0. For each dataset, 100 independent runs of the K-means algorithm with squared Euclidean distance and random seeds were performed (MacQueen, 1967). Only the run with minimal total sum of distances was retained. In order to determine the total

number K of clusters in the segmentation, a sweep in K space between 1 and 20 was performed, and the results were inspected with silhouette plots. For example, when analyzing the data displayed in **Figure 5**, $K = 12$ was found to be the best solution. Importantly, the neuronal clusters shown in this figure, which are the most compact, proved robust with respect to changes in K between 10 and 20.

RESULTS

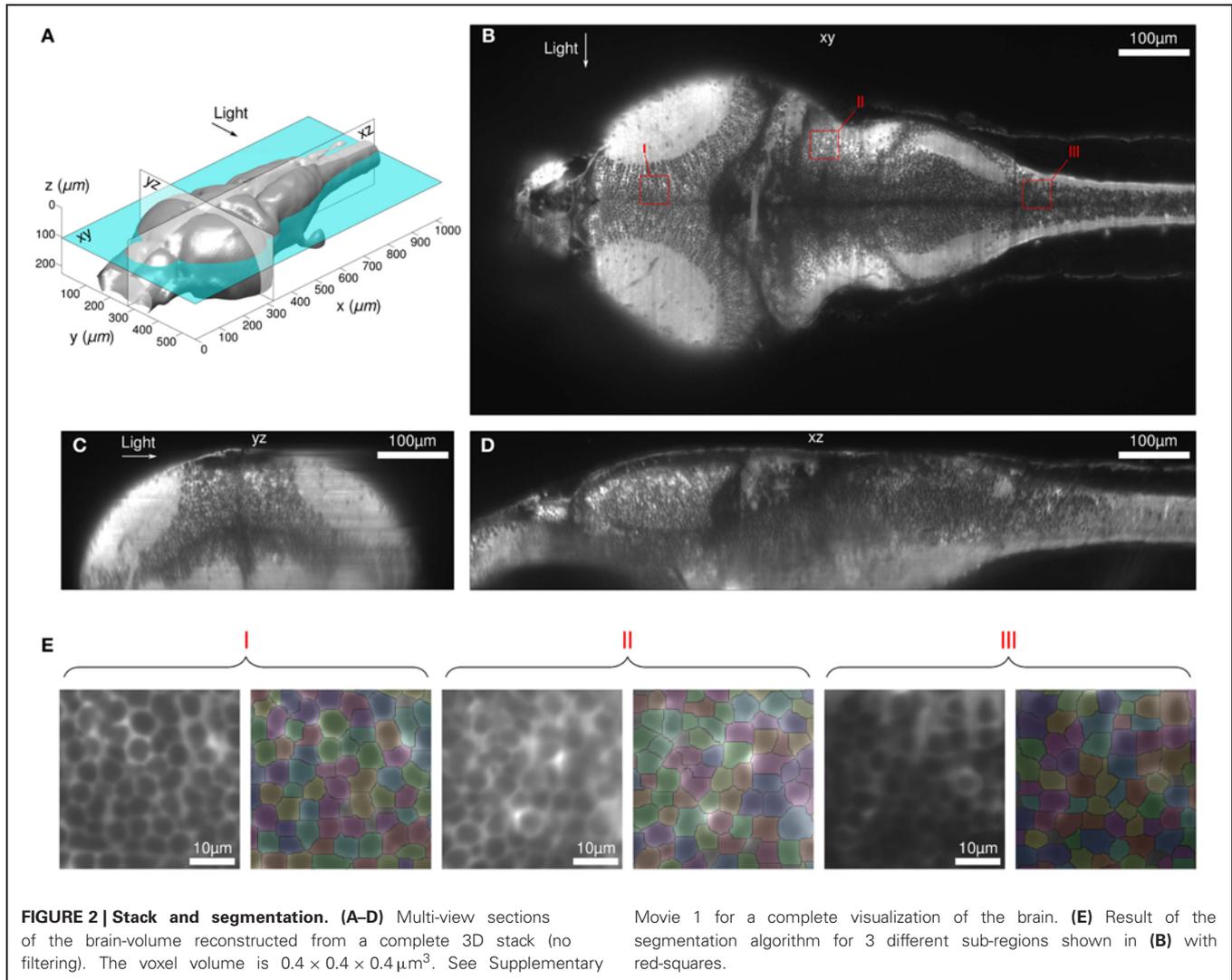
Our main objective was to establish the advantages and limitations of SPIM for *in-vivo* functional imaging in zebrafish. Spontaneous activity was recorded in 5–9-day-old HuC:GCaMP3 zebrafish larvae. First, we characterized the volume of the brain accessible to single-cell calcium imaging using SPIM. Second, we estimated the gain in the number of neurons that could be simultaneously sampled, and in the maximum accessible acquisition rate, that this imaging strategy provides compared to standard 2P-PSM experiments. Finally, we showed how the extended FOV provided by SPIM allows one to probe correlations in spontaneous activity among multiple brain regions as an indication of inter-regional brain connectivity.

OPTICAL SECTIONING EFFICIENCY OF THE SPIM SET-UP

In SPIM, the efficiency of the optical sectioning is set by the thickness of the illumination sheet. As expected for scanned illumination with a Gaussian beam, the laser sheet profile was found to be invariant along the scanning axis and to display a hyperbolic profile along the light propagation axis, with a diffraction-limited minimum thickness of $2.3\ \mu\text{m}$ located at the focal plane of the illumination objective (see **Figure 1B**). This value was found to increase to $7\ \mu\text{m}$ at a distance of $80\ \mu\text{m}$ from the waist. Given the characteristic inter-neuron distance (of the order of $7\ \mu\text{m}$), the method thus yields single neuron resolution over a FOV of $\approx 160 \times 1000\ \mu\text{m}$ around the midline of the larva, a region which contains the majority of the somata. In the most distal regions of the zebrafish brain, the illumination sheet spans 1–2 neuron diameter such that SPIM does not provide single-cell resolution.

Despite this limited axial resolution, the images appeared highly contrasted in most of the brain volume, allowing for the implementation of an automatic segmentation algorithm in order to identify ROIs associated with each neuron. This aspect of the method is illustrated in **Figure 2**. Images were taken at successive z-positions with $0.4\ \mu\text{m}$ intervals across the brain over a total vertical distance of $220\ \mu\text{m}$ (see Supplementary Movie 1). The exposure time was set to 100 ms such that the complete stack was acquired in less than 1 min. We were able to automatically identify virtually all the somata throughout the brain volume except for small telencephalic regions located in the shadow of the eye and in the neuropil regions.

The robustness of the automatic segmentation procedure is illustrated in **Figure 2B** for different brain areas at a depth of $104\ \mu\text{m}$, which corresponded to the middle of the preceding stack. The segmentation was performed on the image obtained by time-averaging 18,000 frames acquired at 10 Hz over 30 min, which corresponds to a typical neural recording configuration. The possibility to automatically identify somata's ROIs is a crucial



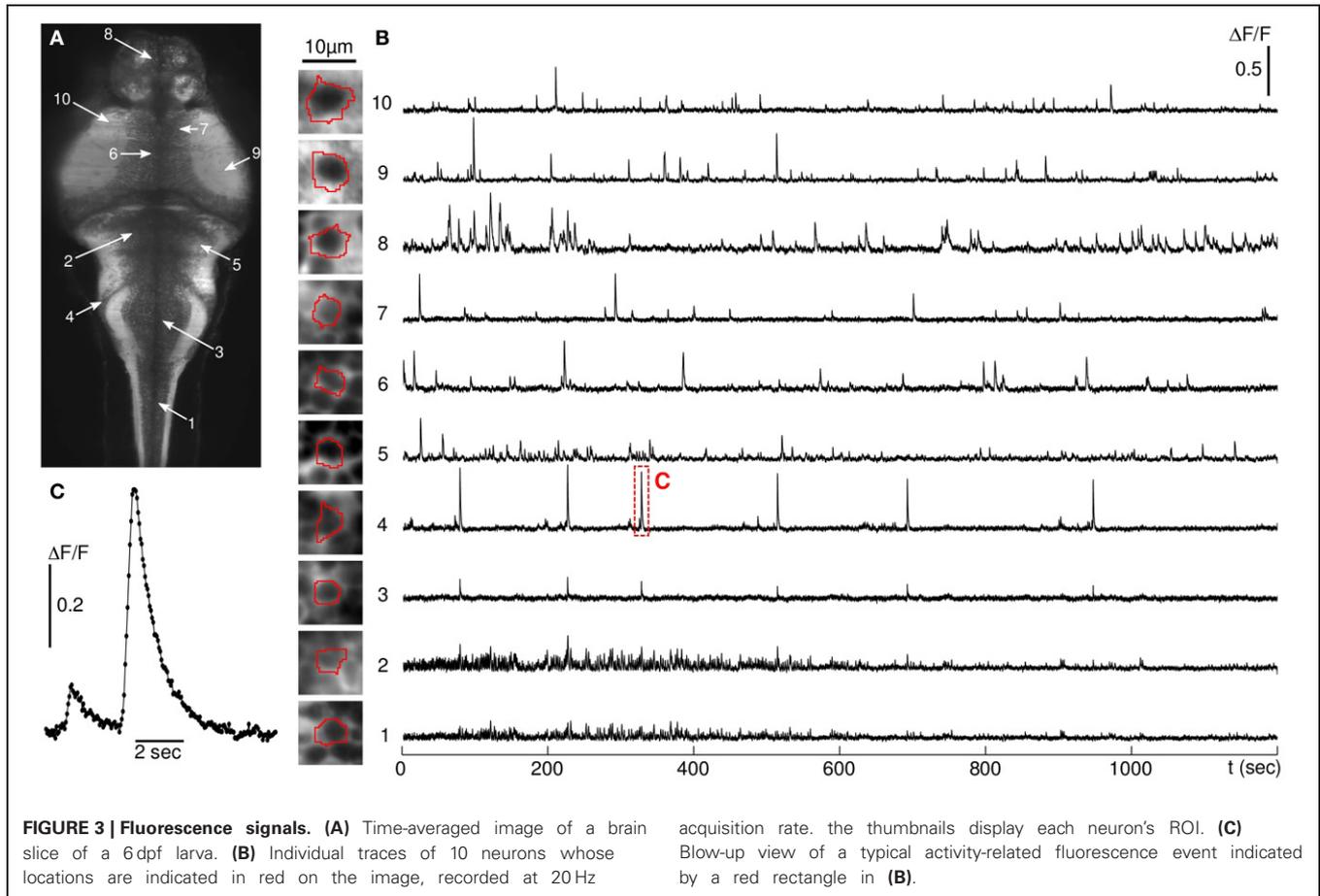
aspect of the present approach, since the manual outlining of $\approx 5,000$ neurons per plane would otherwise impose a severe practical limit on the method.

One should be aware that the light sheet thickness measurement described in Materials and Methods provides an upper bound for the axial resolution in the actual experiment. When imaging the brain volume, the scattering of the illumination beam tends to reduce the effective axial resolution. Similarly, the x-y resolution is expected to be degraded by the scattering of the fluorescence photons. The magnitude of these effects was estimated by computing the cellular-scale contrast, defined as the difference in intensity between the brightest and dimmest pixels (second and 98th percentile) over areas slightly larger than the somata characteristic ROIs. As anticipated, the contrast was found to be maximum in the most dorsal region of the fish, where the distances traveled by the illumination and fluorescent photons were both minimum. The contrast then decreased continuously with the depth of observation, but with a moderate decay rate of $40 \pm 5\%$ per $100 \mu\text{m}$.

FAST, BRAIN-WIDE CALCIUM IMAGING

Images of a single z-plane were acquired at 10–20 Hz (50–100 ms exposure time) over periods of 20–60 min (a short excerpt of a 10 Hz recording is provided in supplementary Movie 2). In the majority of the experiments, the plane of observation was chosen to encompass a large number of neurons from all major brain regions (spinal cord, hindbrain, midbrain, and forebrain). After automatic segmentation, the relative fluorescence time series dF/F was extracted for each individual soma and for neuropil regions of similar area (**Figure 3**).

As no external stimulation was applied, the recorded fluorescence dynamics reflected spontaneous neural activity. Strictly speaking, the illumination wavelength (488 nm) being within the fish visual spectrum, the larva was submitted to a visual stimulation. However, owing to the rapid scanning rate (>200 Hz), such a stimulation can be considered physiologically time-invariant and the fish is expected to habituate rapidly. Consistently, we did not observe any systematic change in the level of neural activity over the duration of the experiments. This was



checked by computing the mean of the activity-related transients in the first and second half of the runs. The difference between both measurements was not found to be statistically significant.

In all runs, the laser intensity was set to 2 mW. At this power, the fluorescence baseline did not display any noticeable decay over the duration of the experimental runs, which indicated the absence of significant photo-bleaching. Furthermore, as already mentioned, the level of activity showed no systematic change. Both observations provided a solid indication that phototoxicity effects should be rather limited at this level of illumination. At 6 mW, although the level of photo-bleaching was still relatively modest ($\approx 10\%$ baseline intensity decay in 20 min), the activity-related signal from somata in all regions of the brain tended to vanish. This effect was reversible, i.e. the original fluorescence transient level could be recovered by setting the power back to 2 mW. The most plausible interpretation of this set of observations is that before phototoxicity effects become significant, the calcium-bound fluorophores, which have a much higher quantum yield than the unbound species, reached their photo-emission saturation rate resulting in a significant reduction in amplitude of the fluorescence transients.

In some experiments, streaking artifacts were observed in the form of rapid correlated fluctuations of intensity along narrow bands oriented parallel to the illumination axis. These flickering

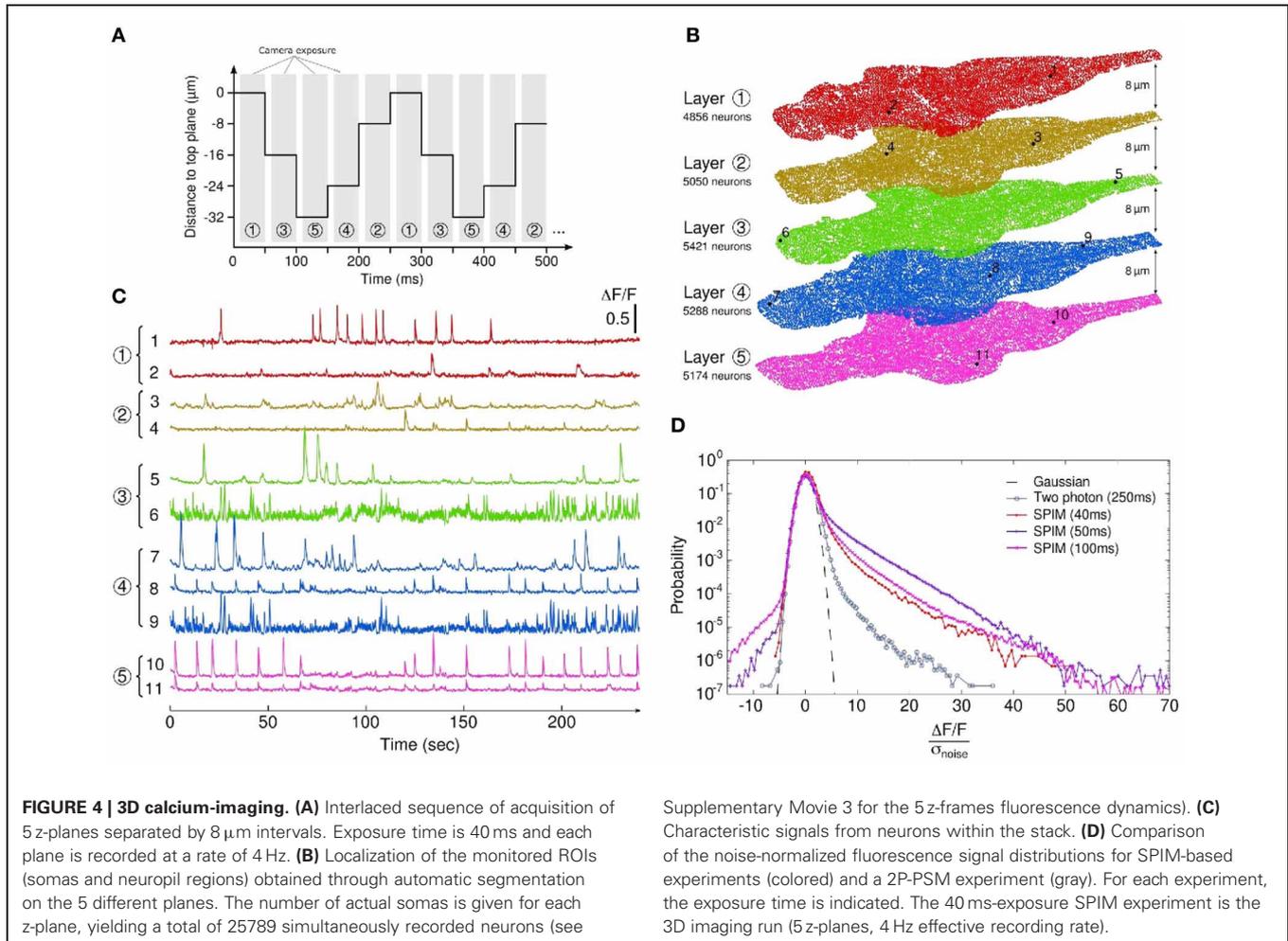
regions resulted from the motion of light absorbing objects (probably the hemoglobin within blood cells) circulating along the exposed face of the animal. As they crossed the light sheet, they projected a thin shadow along the illumination path. When too intense, these fluctuations biased the analysis of the fluorescence signals, so that the corresponding neurons had to be manually eliminated from the analysis.

THREE-DIMENSIONAL CALCIUM-IMAGING

The high data throughput provided by SPIM can be used to obtain dynamic 3D brain-wide recordings of neural activity at a lower acquisition rate. As a proof of concept, we recorded 5 different z-planes, separated by $8 \mu\text{m}$, a distance which guaranteed that neurons from different slices were distinct. Axial scanning was obtained by sequentially moving the specimen at the successive z-positions (Figure 4A). This approach allowed for the simultaneous recording of over 25,000 individual neurons (and large neuropil regions) at 4 Hz. Figures 4B,C shows the location of the centers of mass of the sampled ROIs and the associated dF/F traces for a few neurons, located in different regions of the brain.

EVALUATING THE SIGNAL-TO-NOISE RATIO (SNR)

In order to evaluate the sensitivity of the method, a statistical comparison was made between spontaneous activity recordings



obtained using SPIM and 2P-PSM in the tectal region under comparable experimental conditions (see Materials and Methods, all statistics were computed from three independent runs for each set-up). At 10 Hz acquisition rate, the standard deviation σ_{noise} of the baseline fluorescence signal (extracted for each neuron, see Materials and Methods) using SPIM was found to be of order 1% ($\sigma_{\text{noise}} = 0.008 \pm 0.002$). This quantity was measured at 0.13 ± 0.04 in 2P-PSM at 4 Hz acquisition rate. The relatively low noise level observed in SPIM is a consequence of the larger photon count provided by the method. A significant fraction of these photons, however, originates from regions outside the in-focus ROIs, owing to the less efficient sectioning and the wide-field nature of this optical method. This in turn increases the background signal, thus limiting the amplitude of the dF/F transients. For comparable configurations, 2P-PSM recordings actually displayed statistically higher dF/F peak signals: the average of the dF/F values within the highest percentile was found to be 0.11 and 0.55 in SPIM and 2P-PSM, respectively.

To provide a fair SNR comparison between both methods, each neuronal dF/F distribution was thus normalized by its baseline noise standard deviation σ_{noise} . The

resulting noise-normalized fluorescence distributions are shown in **Figure 4D** for three experimental SPIM runs (single z-plane recordings at acquisition rates 10 and 20 Hz, 5 z-planes 3D recording at 4 Hz) and for a typical run performed at 4 Hz using 2P-PSM. Although the SPIM experiments used lower exposure times (40–100 ms instead of 250 ms), the corresponding distributions appeared to be more significantly skewed toward large positive values as compared to 2P-PSM, which indicated that the SNR was improved. Across all experiments, the skewness of the noise-normalized distribution was found to be 3.70 ± 0.78 in SPIM as compared to 0.54 ± 0.11 in 2P-PSM. Although this difference is statistically significant, one should consider such a determination of the relative SNR as a rough estimate since the level of spontaneous activity in the tectum may vary significantly between runs.

IDENTIFYING BRAIN-WIDE HIGHLY CORRELATED NEURONAL CLUSTERS

One of the important assets of the SPIM method, with respect to PSM approaches, lies in the possibility of simultaneously recording neural activity in distinct brain regions. This in turn enables the identification of ensembles of neurons spanning

different regions of the brain that exhibit correlated activity and are thus likely to be interconnected or activated by a common source. Here we illustrate this possibility by using a 60 min long single plane recording of multiple brain regions at 10 Hz acquisition rate. The fluorescence time-series of each neuron was first thresholded in order to extract activity-related events (see Materials and Methods). The rest of the data points was set to zero. This thresholding was necessary to eliminate coherent baseline noise, induced by minute laser intensity fluctuations, which would have otherwise biased the correlation analysis.

The distribution of pair-wise correlations showed a heavy-tail of fairly large values, suggesting the presence of significantly correlated activity (**Figure 5A**). As a first attempt to identify the optimal clustering of the neural activity time-series, the K-means algorithm was implemented (see Materials and Methods). An example of the computed partitionings is shown in **Figure 5B**, where a reasonable clusterization of highly correlated neuronal groups with moderate cross-talk can be observed. Three of these clusters topographical layouts are shown in **Figures 5C–G**, together with excerpts of (unfiltered) fluorescence traces of 3 neurons within each cluster.

The first cluster revealed significant correlations among neighboring neurons in the optic tectum (**Figure 5C**). Notice that the mean pair-wise correlation was found to continuously decay from a confined region located at the border of the neuropil. The second cluster consisted of neurons mostly located in the spinal cord (**Figure 5E**). In the first 10 min of the run, these neurons exhibited characteristic rhythmic synchronous activity at a typical frequency of 0.2 Hz (see **Figure 5F**). In the paralyzed preparation, these bouts of spinal cord activity are likely to be associated with fictive swimming events. The large FOV allowed us to further identify a sub-population of distant neurons located in two bilaterally symmetric confined regions, which probably correspond to the medial octavolateralis nucleus. A similar cluster of correlated neurons was observed in another animal exhibiting fictive swimming. Finally, stripes of neurons located in the vagal lobe, a brain structure implicated in the processing of gustatory stimuli, were found to be correlated with distant bilaterally symmetric neuronal clusters probably located at the secondary gustatory nuclei (SGN), in the isthmus ventrally to the cerebellum (**Figure 5G**). It should be noticed that these three functional clusters, associated with three distinct modalities (visual, motor, and gustatory), were identified from a single 60 min long recording of a single z-plane.

DISCUSSION

In PSM-based calcium-imaging, neurons are probed sequentially, which imposes a trade-off between the number of sampled neurons N_{cells} and the acquisition rate f_{acq} (Lütcke and Helmchen, 2011). In order to increase the maximum of the product $N_{\text{cells}}f_{\text{acq}}$, AOM-based random scanning approaches have been developed, which aimed at minimizing the time wasted in acquiring regions outside the neurons volume. Notice that this issue is almost irrelevant in zebrafish, since most of the brain consists of tightly packed somata (almost no extra-cellular space). A fundamental limit in data throughput is, however, set by the minimum dwelling time

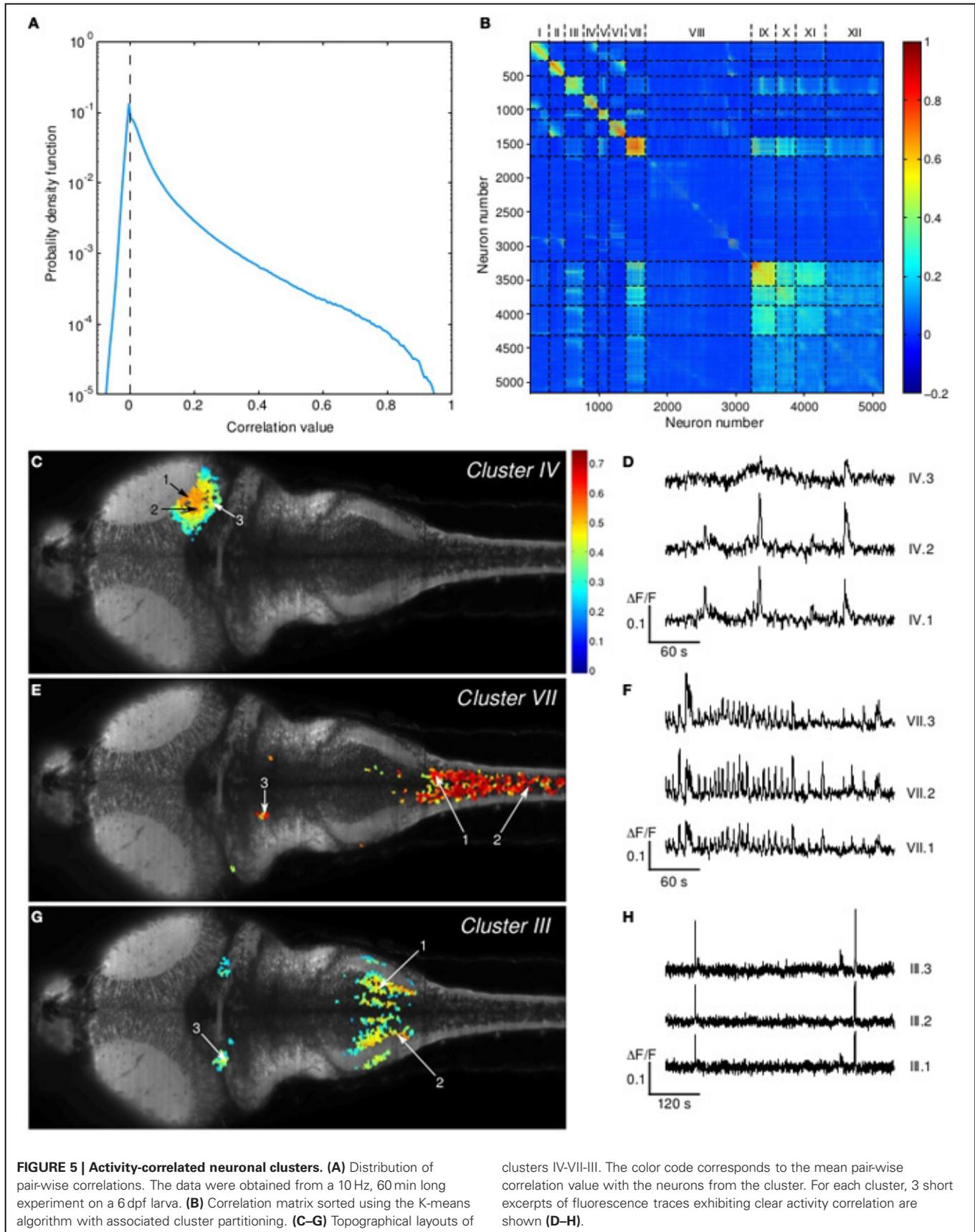
of the laser at each voxel required to record a significant number of photons.

Scanned laser sheet imaging also relies on sequential recording of neurons, but those within a given line are illuminated and recorded in parallel. As established in the present experiment, this yields a $\simeq 20$ -fold increase in the accessible $N_{\text{cells}}f_{\text{acq}}$ product for similar experimental conditions. Hence, while current PSM-based calcium-imaging set-ups in zebrafish allow monitoring $\simeq 1000$ neurons at 5 Hz, SPIM allows monitoring up to 5,000 neurons from a single z-plane at 20 Hz, and over 25,000 neurons from 5 different z-planes at 4 Hz, with similar or better SNR. This large increase in data throughput offered by SPIM-based calcium imaging opens new opportunities for studying various aspects of neural processes.

TOWARD *in toto* DYNAMIC NEURAL RECORDING OF A VERTEBRATE BRAIN

Larval zebrafish constitutes a unique vertebrate system to study the activity of brain-wide neural circuits and help decipher the way information is processed across different brain regions. This possibility was illustrated in a recent paper by Ahrens et al. (2012). By recording calcium activity in an animal that interacted fictively with a virtual environment, the authors were able to identify neural populations spanning multiple brain areas that were activated during specific phases of adaptive locomotion. Owing to the limited number of neurons sampled during a single recording, different experiments and animals had to be fused in order to produce a complete physiological map of the associated neural networks. This approach was not only time-consuming but also implicitly assumed that the recruited neuronal population was invariant from run to run and animal to animal. In order to overcome these limitations, one would need to *simultaneously* record the complete brain. This would allow for the gathering of similar data on a single-trial basis, and thus permit one to probe the variability in the spatial pattern of the recruited neural population.

In its current configuration, our SPIM set-up allows one to simultaneously sample $\simeq 30\%$ of the total number of neurons (Hill et al., 2003) at 4 Hz. Given the decay time of GCaMP3 (of the order of 0.5 s), this acquisition rate guarantees that any calcium transient for a given neuron within this volume is detected. This result was shown as a proof-of-concept and further refinements are needed. In particular, axial scanning was obtained by continuously moving the sample across the light-sheet. This approach presents two major drawbacks. First, it submits the larva to an oscillatory acceleration of maximum amplitude of order $0.1 \text{ ms}^{-2} = 10^{-2} g$ where g is the gravitational acceleration. Although relatively low, this inertial stimulation may trigger responses from the fish's vestibular system. Second, the softness of the agar gel limits the rate at which successive z-positions can be imaged, since a significant time is needed for the cylinder to come to rest. Both issues could be addressed by maintaining the specimen fixed while synchronously moving the laser sheet (using a second galvanometric mirror) and the observation objective. Higher z-scanning rates could also be obtained by using tunable optical components (Grewe et al., 2011). Given the constant progress in GECI sensitivity (Akerboom et al., 2012) and sCMOS



sensors, SPIM-based calcium imaging should provide virtually full brain simultaneous recording at several Hertz in the near future.

PROBING THE TIME-STRUCTURE OF BRAIN-WIDE NEURAL ACTIVITY PATTERNS

Calcium-imaging was originally seen as a way to overcome the limitation in the number of neurons that could be recorded using electrophysiological approaches. For a long time, it was believed that an inevitable corollary of this method was to sacrifice temporal information as the calcium signals were typically probed at a few Hertz, far below physiological timescales. In recent years, several fast imaging experiments proved this assumption wrong. Recently, Grewe *et al.* demonstrated a ≈ 10 ms resolution on the firing dynamics of individual neurons based on calcium-imaging performed at hundreds of Hertz (Grewe *et al.*, 2010). This time-resolution was actually set by the intrinsic dynamics of the fluorescent calcium indicator (Oregon Green BAPTA-1). This achievement demonstrated that calcium-imaging could constitute a suitable method for probing neural networks dynamics with near-millisecond resolution, and thus could serve to explore how spike-timing may play a role in neural processes. However, this exciting result was obtained at the cost of the number of probed neurons, of the order of a few tens *i.e.* close to that currently recorded using silicon-based nanoprobe. Fast *in vivo* neural recordings are thus currently restricted to spatially confined micro-circuits. In contrast, SPIM should allow reaching high acquisition rates while still probing a large number of neurons. In the present experiments, the acquisition rate was limited to 20 Hz since the relatively slow GCaMP3 rising time (of the order of 100 ms) sets the bandwidth within which spiking dynamics can be efficiently probed. Increasing the acquisition rate would only degrade SNR without enhancing the time-resolution. With sufficiently rapid and sensitive calcium reporters—such as the synthetic sensors used by Grewe *et al.* (2010)—it should be possible to record up to 1000 neurons with near-millisecond resolution.

Several limitations of this method still need to be addressed. First, the optical sectioning only guarantees single-cell resolution in the most proximal part of the brain. Different methods could be implemented to increase the axial resolution, such as structured illumination (Keller *et al.*, 2010) or confocal light-sheet imaging (Silvestri *et al.*, 2012). A second issue is related to the use of visible light illumination (488 nm), which currently hampers the proper stimulation of the fish visual system. This limitation could be circumvented by using two-photon fluorescence excitation with the same SPIM geometry (Palero *et al.*, 2010; Truong *et al.*, 2011). This would in turn open the possibility to implement Bessel-beam illumination. Beyond the expected gain in optical sectioning efficiency provided by this method (Planchon *et al.*, 2011), the self-healing property of Bessel beams may permit to mitigate the problems of streaking.

In the present article, we have demonstrated how the extended FOV provided by this alternative imaging strategy allows one to identify brain-wide functional neuronal circuits by straightforward correlation analysis of the spontaneous activity pattern. Overall, the combination of SPIM-based functional imaging, transgenic larvae and methods for statistical data analysis will lead to the generation of a whole brain atlas of functional neuronal connectivity, either by monitoring spontaneous or sensory-evoked activity, or through localized channelrhodopsin-2 stimulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laurent Bourdieu and Jean-François Leger for constant support and numerous advices throughout the assembly of the SPIM set-up. This work was supported in part by EraSysBio+ ZeBrain and ERC stg 243106.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://www.frontiersin.org/Neural_Circuits/10.3389/fncir.2013.00065/abstract

REFERENCES

- Ahrens, M. B., Li, J. M., Orger, M. B., Robson, D. N., Schier, A. F., Engert, F., *et al.* (2012). Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish. *Nature* 485, 471–477.
- Aizenberg, M., and Schuman, E. M. (2011). Cerebellar-dependent learning in larval zebrafish. *J. Neurosci.* 31, 8708–8712.
- Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., *et al.* (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* 32, 13819–13840.
- Alivisatos, A., Chun, M., Church, G. M., Greenspan, R. J., Roukes, M. L., and Yuste, R. (2012). The brain activity map project and the challenge of functional connectomics. *Neuron* 74, 970–974.
- Bollmann, J. H., and Engert, F. (2009). Subcellular topography of visually driven dendritic activity in the vertebrate visual system. *Neuron* 61, 895–905.
- Del Bene, F., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E. K., *et al.* (2010). Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit. *Science* 330, 669–673.
- Denk, W., Strickler, J., and Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76.
- Dombeck, D. A., Khabbazi, A. N., Collman, F., Adelman, T. L., and Tank, D. W. (2007). Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43–57.
- Du, J., Blanche, T. J., Harrison, R. R., Lester, H. A., and Masmanidis, S. C. (2011). Multiplexed, high density electrophysiology with nanofabricated neural probes. *PLoS ONE* 6:e26204. doi: 10.1371/journal.pone.0026204
- Engelbrecht, C. J., Voigt, F., and Helmchen, F. (2010). Miniaturized selective plane illumination microscopy for high-contrast *in vivo* fluorescence imaging. *Opt. Lett.* 35, 1413–1415.
- Grewe, B. F., Langer, D., Kasper, H., Kampa, B. M., and Helmchen, F. (2010). High-speed *in vivo* calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision. *Nat. Methods* 7, 399–405.
- Grewe, B. F., Voigt, F. F., van't Hoff, M., and Helmchen, F. (2011). Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens. *Biomed. Opt. Express* 2, 2035–2046.
- Grienberger, C., and Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73, 862–885.
- Higashijima, S.-I., Masino, M. A., Mandel, G., and Fetcho, J. R. (2003). Imaging neuronal activity during zebrafish behavior with a genetically encoded calcium indicator. *J. Neurophysiol.* 90, 3986–3997.
- Hill, A., Howard, C. V., Strahle, U., and Cossins, A. (2003). Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicol. Sci.* 76, 392–399.
- Holekamp, T. F., Turaga, D., and Holy, T. E. (2008). Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron* 57, 661–672.

- Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., and Stelzer, E. H. K. (2004). Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305, 1007–1009.
- Katona, G., Szalay, G., Maak, P., Kaszas, A., Veress, M., Hillier, D., et al. (2012). Fast two-photon *in vivo* imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. *Nat. Methods* 9, 201–208.
- Keller, P. J., and Dodt, H.-U. (2012). Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 138–143.
- Keller, P. J., Schmidt, A. D., Santella, A., Khairy, K., Bao, Z., Wittbrodt, J., et al. (2010). Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nat. Methods* 7, 637–642.
- Lillis, K. P., Eng, A., White, J. A., and Mertz, J. (2008). Two-photon imaging of spatially extended neuronal network dynamics with high temporal resolution. *J. Neurosci. Methods* 172, 178–184.
- Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L., and Raible, D. W. (1999). Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* 126, 3757–3767.
- Lütcke, H., and Helmchen, F. (2011). Two-photon imaging and analysis of neural network dynamics. *Rep. Prog. Phys.* 74:086602. doi: 10.1088/0034-4885/74/8/086602
- MacQueen, J. (1967). “Some methods for classification and analysis of multivariate observations,” in *Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, Vol. 1, (Berkeley, CA: University of California Press), 281–297.
- McLean, D. L., and Fetcho, J. R. (2009). Spinal interneurons differentiate sequentially from those driving the fastest swimming movements in larval zebrafish to those driving the slowest ones. *J. Neurosci.* 29, 13566–13577.
- Mertz, J. (2011). Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat. Methods* 8, 811–819.
- Niell, C. M., and Smith, S. J. (2005). Functional imaging reveals rapid development of visual response properties in the zebrafish tectum. *Neuron* 45, 941–951.
- Palero, J., Santos, S. I. C. O., Artigas, D., and Loza-Alvarez, P. (2010). A simple scanless two-photon fluorescence microscope using selective plane illumination. *Opt. Express* 18, 8491–8498.
- Park, H. C., Kim, C. H., Bae, Y. K., Yeo, S. Y., Kim, S. H., Hong, S. K., et al. (2000). Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev. Biol.* 227, 279–293.
- Planchon, T. A., Gao, L., Milkie, D. E., Davidson, M. W., Galbraith, J. A., Galbraith, C. G., et al. (2011). Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nat. Methods* 8, 417–423.
- Ramdy, P., and Engert, F. (2008). Emergence of binocular functional properties in a monocular neural circuit. *Nat. Neurosci.* 11, 1083–1090.
- Salomé, R., Kremer, Y., Dieudonné, S., Léger, J.-F., Krichevsky, O., Wyart, C., et al. (2006). Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors. *J. Neurosci. Methods* 154, 161–174.
- Silvestri, L., Bria, A., Sacconi, L., Iannello, G., and Pavone, F. S. (2012). Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain. *Opt. Express* 20, 20582–20598.
- Stevenson, I. H., and Kording, K. P. (2011). How advances in neural recording affect data analysis. *Nat. Neurosci.* 14, 139–142.
- Sumbre, G., Muto, A., Baier, H., and Poo, M.-M. (2008). Entrained rhythmic activities of neuronal ensembles as perceptual memory of time interval. *Nature* 456, 102–106.
- Tian, L., Hires, S. A., and Looger, L. L. (2012). Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012, 647–656.
- Tomer, R., Khairy, K., and Keller, P. J. (2011). Shedding light on the system: studying embryonic development with light sheet microscopy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 558–565.
- Truong, T. V., Supatto, W., Koos, D. S., Choi, J. M., and Fraser, S. E. (2011). Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nat. Methods* 8, 757–760.
- Turaga, D., and Holy, T. E. (2012). Organization of vomeronasal sensory coding revealed by fast volumetric calcium imaging. *J. Neurosci.* 32, 1612–1621.
- Verveer, P. J., Swoger, J., Pampaloni, E., Greger, K., Marcello, M., and Stelzer, E. H. K. (2007). High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nat. Methods* 4, 311–313.
- Weber, M., and Huisken, J. (2011). Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 566–572.
- Wyart, C., Del Bene, F., Warp, E., Scott, E. K., Trauner, D., Baier, H., et al. (2009). Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461, 407–410.
- Yuste, R., and Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682–684.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 08 February 2013; accepted: 25 March 2013; published online: 09 April 2013.

Citation: Panier T, Romano SA, Olive R, Pietri T, Sumbre G, Candelier R and Debrégeas G (2013) Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy. *Front. Neural Circuits* 7:65. doi: 10.3389/fncir.2013.00065

Copyright © 2013 Panier, Romano, Olive, Pietri, Sumbre, Candelier and Debrégeas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

RÉSUMÉ :

Un tiers de la thèse couvre la conception et le montage d'une expérience de stimulation tactile chez l'humain. En utilisant la microneurographie, nous avons pu enregistrer la réponse neuronale des mécanorécepteurs lorsqu'ils sont stimulés de façon précise et contrôlable. Notre dispositif permet le contrôle de la position, l'orientation, la vitesse et de la force d'appui de la stimulation via une texture micro-usinée par nos soins. Ainsi les conditions sont réunies pour étudier de façon systématique la transduction de l'information tactile, qui se trouve d'abord dans la surface à sonder puis passe dans le codage par les neurones du système nerveux.

La seconde partie concerne le montage d'un microscope par nappe laser appliqué à l'enregistrement de l'activité neuronale d'une larve de poisson-zèbre. Le but est de se doter d'un outil permettant d'observer la totalité de la chaîne de transmission de l'information mécano-sensorielle : du récepteur au cerveau. Les poissons sont génétiquement modifiés pour exprimer le rapporteur calcique GCaMP3 dans chacun de leurs neurones. Le microscope à nappe laser, où l'éclairement du spécimen se fait par le côté avec un faisceau laser scanné et l'observation se fait par le dessus selon un axe perpendiculaire au plan d'éclairement, permet d'augmenter à la fois la fréquence de prise d'images et la taille du champ enregistré par rapport aux techniques usuelles (microscope confocal ou 2-photons). Ces gains sont mis à profit pour étudier les corrélations entre les signaux de neurones distribués dans l'ensemble du cerveau de la larve du poisson-zèbre, et mettre directement à jour les sous-réseaux à l'œuvre au cours de l'activité cérébrale.

Mots-clé : transduction — mécanorécepteurs — microneurographie — poisson-zèbre — imagerie calcique — nappe laser

**Imaging the neuronal activity from the whole brain of a zebrafish
using Selective Plane Illumination Microscopy.**

ABSTRACT :

One third of the manuscript deals with the design of a set-up to deliver tactile stimulation to a human subject. Using microneurography, we recorded the neural response of the mechanoreceptors during a controlled stimulation. The set-up provides precise control over the position, the orientation, the speed and the loading force of a stimulus that we machined on a micro-mill. Thus we can study the transduction of the information, from initially contained in the surface geometry up to the neural coding.

The second part shows the construction of Single Plane Illumination Microscope designed to record the neuronal activity of a zebrafish larva. We aim at recording the whole chain of transmission from the sensor to the brain. The fish are genetically modified to express the GCaMP3 calcium indicator in each of their neurons. With the SPIM, where the excitation light comes from the side of the specimen in the shape of a lightsheet and the observation is made from the top at a 90 degrees angle, we can increase the frame rate and the size of the field of view simultaneously, compared to usual techniques (confocal or 2-photons microscopes). These improvements are used to study the correlations between signals from neurons distributed all over the larva's brain, and discover the underlying networks.

Keywords : transduction — mechanoreceptors — microneurography — zebrafish — calcium imaging — laser sheet