



Perception des écoulements et des vibrations chez la larve de poisson-zèbre : étude comportementale et imagerie

Raphaël Olive

► **To cite this version:**

Raphaël Olive. Perception des écoulements et des vibrations chez la larve de poisson-zèbre : étude comportementale et imagerie. Physique [physics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066468>. <tel-01293005>

HAL Id: tel-01293005

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01293005>

Submitted on 24 Mar 2016

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

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

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : PHYSIQUE

École doctorale 389 : La physique de la particule à la matière condensée

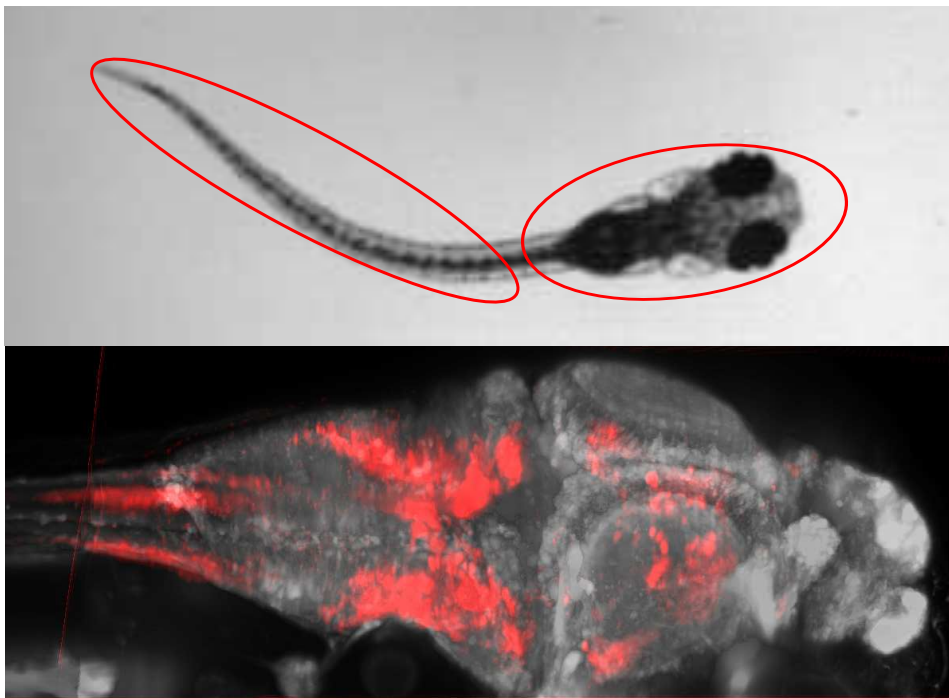
présentée par
Raphaël OLIVE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE



**Perception des écoulements et des vibrations
chez la larve de poisson-zèbre**

Etude comportementale et imagerie



Thèse soutenue le 15 décembre 2015 devant le jury composé de :

M. Georges DEBREGÉAS	Directeur de thèse
Mme. Cristina PUJADES	Rapportrice
M. Jean-François LEGER	Rapporteur
M. Axel BUGUIN	Examineur
M. Brice BATHELLIER	Examineur
M. Pascal MARTIN	Examineur
M. Raphaël CANDELIER	Co-directeur de thèse

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. étudiants de EM à ME : 01 42 34 68 41
Tél. étudiants de MF à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Dédicace.

Abstract

The Zebrafish larva is a model for the study of vertebrate central nervous system. Mutants have been developed which express calcium reporter (GCaMP) in their neurons. These mutants are used in functional imaging experiments in which the activity of almost all the neurons is simultaneously recorded.

The first chapter of this thesis is devoted to the conception of a behavioral experiment designed to record and analyse the swim movements of zebrafish larvae submitted to a suction flow. The contributions of lateral line (specific fish organ responsible for the perception of hydrodynamic stimulations) and visual system have been separated in order to describe the interactions between those two modalities and their respective effects on larvae reactions to aspiration, analysed through their swim patterns. This experiment was thought to prepare a study of neuronal responses to aspiration, thanks to the laser sheet microscopy setup developed in the laboratory since four years. The aim was to use calcium imaging to work on cross-modal experiment, by the dynamic observation of neural networks dedicated to the two sensory modalities when stimulated simultaneously or separately.

Facing difficulties to record lateral line response using calcium imaging, which are not been recorded yet, functional imaging experiments have addressed zebrafish larvae auditory system instead of hydrodynamic perception. The second part of this thesis describes protocols, analysis and results from these experiments. The results are still at an exploratory stage but draw a scheme of neural networks involved in vibrations perception in zebrafish larvae : they present recordings of a huge part of central nervous system and the activity evoked by auditory stimulations.

Keywords : Zebrafish

Résumé court

La larve de poisson-zèbre est un animal modèle pour l'étude du système nerveux des vertébrés, dont certains mutants expriment des rapporteurs calciques (GCaMP) à l'intérieur de leurs neurones. Ces mutants sont utilisés pour des expériences d'imagerie fonctionnelle dans lesquelles l'activité de la quasi-totalité de leur système nerveux est enregistrée simultanément.

La première partie de cette thèse est consacrée à la conception d'une expérience comportementale permettant de suivre et d'analyser les mouvements de nage de larves de poisson-zèbre plongées dans un écoulement d'aspiration. Les contributions de la ligne latérale, organe spécifique aux poissons et amphibiens responsable de la perception des stimulations hydrodynamiques, et des yeux ont été découplées afin de pouvoir décrire les interactions entre ces deux modalités sensorielles et leurs effets respectifs sur les réactions des larves à une aspiration, analysés par le biais de leur mouvements de nage. Cette expérience devait être préliminaire à une étude des réponses neuronales à une aspiration grâce au montage expérimental de microscopie par nappe laser développé au laboratoire depuis quatre ans, afin de réaliser des expériences de cross-modal en imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire l'observation dynamique des réseaux neuronaux consacrés au deux modalités sensorielles lorsque celles-ci sont stimulées soit simultanément, soit séparément.

Devant les difficultés rencontrées pour observer les réponses de la ligne latérale des larves en imagerie calcique, ce qui n'a à ce jour jamais été réalisé, nos expériences d'imagerie fonctionnelle se sont reportées sur l'audition de la larve de poisson-zèbre, qui a remplacé la perception des écoulements. La deuxième partie de cette thèse décrit donc les protocoles, les méthodes d'analyse et les résultats issus de cette série d'expériences dont les résultats, encore exploratoires, donnent une idée des réseaux de neurones impliqués dans la perception des vibrations par la larve de poisson-zèbre. Ces premières analyses encourageantes, en plus de présenter pour la première fois des enregistrements d'une grande partie du système neuronal sous stimulation auditive, ouvrent la porte à de nouvelles méthodes d'analyse de données pour des populations de neurones à la fois nombreuses et spatialement étendues.

Mots clés : Poisson-zèbre

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Georges et Raphaël pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée dans mon travail. Ces trois ans de doctorat ont été pour moi l'occasion d'apprendre le métier d'expérimentateur, grâce aux nombreuses heures qu'ils ont passées à me former avec une patience et une bonne humeur que rien n'a pu ébranler.

Ensuite, je remercie pour tous leurs coups de mains les membres de l'équipe Imagerie calcique et comportement de la larve de poisson-zèbre, Volker, Sébastien et Thomas pour les aspects expérimentaux et Alexis et Jérôme pour la partie d'analyse de données. Au-delà de nos fréquentes collaborations et discussions qui font chaque jour avancer notre travail, c'est l'excellente atmosphère qui règne au sein de cette équipe que je souhaiterais célébrer ici, et que je retiendrai spécialement.

Même si ils n'ont pas été directement liés à l'avancée de mon travail, tous les moments partagés avec les membres du laboratoire Jean Perrin ont été des bouffées d'oxygènes nécessaires pour garder moral et motivation intacts. Mention spéciale à Nayélie, avec qui on a partagé les moments hauts comme bas de la vie de thésard (surtout bas comme ça on a pu se plaindre un peu), à Didier, Philippe et Jérôme pour toutes les discussions extra-scolaires, et Elie pour les intermèdes musico-comiques. Merci à tous d'avoir été là pour rendre certaines périodes moins difficiles en m'aérant l'esprit, souvent par le rire qui est souvent la meilleure thérapie.

Merci enfin à Marie-Nicole pour avoir toujours été là, et nous avoir distillé, toujours au bon moment, sourires et attentions sucrées pour garder la pêche.

Ce doctorat a également été pour moi l'occasion de faire mes premiers pas dans l'enseignement universitaire via le monitorat, et je tiens à remercier mes collègues enseignants qui se sont assurés que j'étais dans les meilleures dispositions pour découvrir l'envers du décor et y trouver ma place. Merci donc à Vincent pour m'avoir soutenu lors des projets expérimentaux lorsque j'ai souhaité en créer un, et à Marie-Anne et Samuel pour m'avoir épaulé lors de mes premières séances de travaux dirigés. Cette expérience m'a donné envie de garder contact avec l'enseignement, et le fait de vous avoir eu comme collègues y est pour quelque chose.

Enfin, je souhaite remercier ma famille et mes amis pour m'avoir soutenu tout au long de ces trois années. Evidemment, une pensée particulière pour Elo, dont j'espère que la thèse se finira aussi bien que la mienne, et à mes parents, qui ont toujours été là.

Table des matières

1	Introduction	5
2	Ligne latérale	9
2.1	Imagerie calcique	9
2.1.1	Techniques d'enregistrement de signaux neuronaux	9
2.1.2	Rapporteur calcique utilisé : GCaMP6f	12
2.1.3	Dispositifs d'observation en imagerie calcique	13
2.1.4	L'imagerie calcique chez la larve de poisson-zèbre	15
2.1.5	Perspectives	16
2.2	Expérience comportementale multimodale	19
2.2.1	Etat de l'art	19
2.2.2	Origine du dispositif et description du système	21
2.3	Article	24
2.4	Stimulations sous nappe laser	40
2.4.1	Microfabrication et dispositif de stimulation	40
2.4.2	Nécessité de libérer la queue des larves	40
3	Détection d'ondes acoustiques	47
3.1	Introduction et état de l'art	47
3.1.1	Description et fonctionnement de l'oreille interne des poissons	48
3.1.2	Réseaux neuronaux de la voie auditive	50
3.1.3	L'audition chez la larve de poisson-zèbre	50
3.2	Présentation du système	51
3.2.1	Système d'observation	51
3.2.2	Système de stimulation	54
3.2.3	Description des protocoles	58
3.3	Présentation des méthodes d'analyse	60
3.3.1	Des images brutes à un signal de fluorescence	62
3.3.2	Traitement du signal : extraction du signal de fluorescence et inférence de spikes	66
3.3.3	Détection des artefacts liés au mouvement	68
3.4	Résultats expérimentaux	70

3.4.1	Morphologie	70
3.4.2	Expériences de type 1 : Courbes de réponse	77
3.4.3	Expériences de type 2 : Regroupement de neurones selon leur variabilité de réponse	93
4	Conclusion	105

Clés de lecture

Abréviations récurrentes :

- **Pdf** signifie *probability density function*.
- **ROI** signifie *Region Of Interest*.

Chapitre 1

Introduction

Parmi tous les domaines de la recherche fondamentale en biologie, celui des neurosciences est un de ceux qui propose le plus de défis à ce jour.

Le fonctionnement du système nerveux peut en effet être décrit à plusieurs échelles, du neurone unique aux circuits localisés dans plusieurs régions du cerveau, chaque échelle faisant appel à de nombreuses notions d'anatomie, de biologie cellulaire, de génétique, etc. La complexité des interactions entre ses éléments constitutifs explique le manque de détails des descriptions actuelles. En effet, le cerveau d'un petit vertébré comme la larve de poisson-zèbre est, à titre d'exemple, un ensemble de près de 100 000 neurones (pour une larve âgée de 6 jours), reliés entre eux par des connexions à l'architecture fortement ramifiée. L'enchevêtrement entre des problèmes biologiques très divers et une population aussi large d'unités en interactions explique les difficultés rencontrées par la communauté scientifique dans ce domaine, mais aussi l'engouement que ce dernier suscite.

Les récents progrès en génétique permettent, chez certaines espèces animales dont le génome est bien connu, le marquage de populations de neurones ciblées à l'aide de modifications génétiques permettant la synthèse de molécules fluorescentes dans les neurones d'intérêt. Ainsi, il est possible d'obtenir des représentations en trois dimensions de certains types de neurones et de leurs projections. Si ces informations structurelles contiennent beaucoup d'information d'un point de vue anatomique et développemental, elles ne renseignent pas sur les motifs d'activité de ces neurones, ni sur les interactions dynamiques entre ceux-ci. Mais depuis quelques années, le développement de *sondes calciques* génétiquement encodées qui couplent l'activité des neurones (via la concentration d'ions calcium) à la fluorescence de molécules exprimées dans leur cytoplasme a offert l'opportunité d'observer *in vivo* l'activité de nombreux neurones par des moyens optiques, donnant naissance à l'imagerie calcique fonctionnelle. Cette technique d'imagerie se situe, en termes d'échelles à la fois spatiale et temporelle, à mi-chemin entre l'IRM (observation de l'intégralité du système nerveux, mais faibles résolutions spatiales et temporelles) et l'électrophysiologie (grande

résolution temporelle, mais très peu d'unités enregistrés simultanément), les deux grandes techniques d'enregistrement neuronales utilisées jusqu'ici.

L'équipe *Imagerie calcique et comportement du poisson-zèbre* du Laboratoire Jean Perrin a mis au point un dispositif d'imagerie calcique par nappe laser tirant parti de cette méthode d'enregistrement et du travail de généticiens ayant développé des lignées de poisson-zèbre (*Danio Rerio*) exprimant une sonde calcique (*GCaMP*) dans la totalité du système nerveux central. Cela a permis, pour la première fois, d'observer l'activité de la quasi intégralité du cerveau d'un vertébré, avec un compromis entre résolutions spatiale et temporelle jusqu'alors sans équivalent.

Durant ma thèse de doctorat, je me suis penché sur des questions de mécanoréception chez la larve de poisson-zèbre, devenu un animal modèle pour les neurosciences. La première partie de cette thèse décrit les résultats d'une expérience de comportement réalisée sur de très nombreux individus, dont l'objectif était de caractériser, via leurs mouvements de nage, le mécanisme de *rhéotaxie*, c'est-à-dire l'ensemble des mouvements permettant aux larves de s'aligner face à un courant et à nager dans la direction opposée, dans le but de maintenir leur position.

Plus précisément, l'objet de cette étude était de comparer les contributions respectives de deux modalités sensorielles que sont la vision et la perception des écoulements par la ligne latérale dans la réponse comportementale des larves. La perception des écoulements est en effet médiée chez les poissons par deux organes sensoriels que sont les yeux et la ligne latérale, un organe composé de faisceaux de cellules ciliées (*neuromastes*) répartis tout le long du corps des larves. La désactivation de cette modalité, via l'ablation chimique des neuromastes, et/ou de la vision, annulée en plongeant les larves dans le noir, ont permis de distinguer des motifs comportementaux liés à l'utilisation des organes sensoriels concernés.

Cette première étude visait à préciser un régime de stimulation induisant des réponses comportementales robustes. Il s'agissait ensuite de les reproduire sur un animal partiellement immobilisé dans un gel d'agar, afin d'enregistrer l'activité cérébrale évoquée par une stimulation hydromécanique. De ces enregistrements pouvaient alors être identifiés des circuits neuronaux, dont les dynamiques seraient mises en parallèle avec les différents types de mouvements de nage observés en fonction du type d'aspiration subi. En dépit de nombreuses tentatives, il nous a été impossible d'observer les réponses neuronales liées à des stimulations de la ligne latérale en imagerie calcique sur un animal fixé, pour des raisons que nous ignorons encore. Nous avons alors décidé d'étudier les réponses neuronales des larves de poisson-zèbre aux vibrations, stimulations connues pour déclencher des réponses de façon systématique, et cette fois observables à l'aide du dispositif à nappe laser.

La seconde partie de cette thèse décrit donc les résultats de ces expériences, sous plusieurs angles : Tout d'abord, une première analyse a mis en lumière les voies neuronales de réponse à des stimulations auditives de même intensité. Cela a permis, en moyennant les images enregistrées au moment des réponses, d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit afin de pouvoir identifier le plus précisément possible les zones cérébrales activées lors des stimulations, à l'aide de nouveaux outils comme l'atlas *Z-Brain* développé très récemment. Des enregistrements sur plusieurs individus ont été confrontés afin de vérifier la robustesse des circuits identifiés. La fusion de ces données a permis de tracer des cartes de réponse en trois dimensions et d'identifier l'ensemble des zones cérébrales activées lors des stimulations.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les réponses neuronales des larves à des stimulations d'amplitude variable, à fréquence fixe (nous n'avons pas observé de tonotopie évidente aux âges auxquels nous avons fait nos expériences, soit 5-6 jours après fertilisation). De ces enregistrements, nous avons pu grâce à nos méthodes d'analyse discerner des populations de neurones selon leurs courbes de réponse, et en particulier des seuils de réponse différents pour différents groupes de neurones. L'utilisation de la nappe laser permet d'obtenir des enregistrements simultanés de neurones pouvant être très éloignés, donc d'observer pour la première fois des interactions à grande distance entre les différents groupes de neurones stimulées par une vibration acoustique, pour finalement tracer une carte des seuils de réponses en trois dimensions pour les neurones répondant aux stimulations.

Chapitre 2

Ligne latérale

Contents

2.1	Imagerie calcique	9
2.2	Expérience comportementale multimodale . . .	19
2.3	Article	24
2.4	Stimulations sous nappe laser	40

2.1 Imagerie calcique

Le dispositif expérimental au centre de cette thèse est un microscope conçu pour capturer des images du système nerveux central de larves de poisson-zèbre, et en tirer des signaux d'activité cérébrale renseignant sur les dynamiques neuronales à l'œuvre dans ses réponses à différents types de stimulations. Nous allons voir dans quel contexte biologique et technologique il a été pensé, les raisons qui ont conduit à sa mise au point, ainsi que ses avantages et limitations.

2.1.1 Techniques d'enregistrement de signaux neuronaux

La description et la compréhension du cerveau est devenu l'un des enjeux majeurs de la biologie, mais le domaine des neurosciences est encore parmi les plus opaques que la communauté scientifique ait à explorer. En cause, le nombre d'éléments biologiques (neurones, synapses) impliqués dans chaque mécanisme, et la complexité ainsi que la diversité des connections reliant ces éléments entre eux. Pour ces raisons, le réseau formé par les neurones de n'importe quel système nerveux, que ce soit celui d'un être humain (10^{10} neurones, 10^{14} synapses) ou du ver *C.Elegans* (302 neurones, 7200 synapses) constitue d'abord un défi de taille en termes d'observation [1] [2] avant même que se posent les questions d'analyse des interactions entre les nombreux ob-

jets observés.

Electrophysiologie Depuis Galvani et sa découverte de l'*électricité animale* [3], le fonctionnement du neurone en tant que brique élémentaire du système nerveux a été bien décrit en termes de potentiels membranaires et de signaux électriques. L'outil majeur qui a permis ces avancées a clairement été l'électrophysiologie, dont les premiers résultats remontent à 1957 [4]. Il s'agit d'insérer *in vivo* une (ou plusieurs) électrode(s) soit au sein de l'une des cellules à enregistrer (*patch-clamp*), auquel cas les courants internes de la cellule peuvent être mesurés précisément, soit dans le milieu extracellulaire pour avoir accès aux signaux de plusieurs cellules aux alentours (dans un rayon de 50 μm). Le principal avantage de cette technique d'enregistrement réside dans la haute fréquence d'échantillonnage des signaux enregistrés, qui peut être de plusieurs kHz. En particulier, cette résolution temporelle permet d'identifier les potentiels d'actions uniques au sein de bouffées d'activité.

L'électrophysiologie souffre cependant de limitations intrinsèquement liées à la nature des outils utilisés pour ces enregistrements : cette méthode est tout d'abord invasive, puisqu'elle passe par l'insertion d'une électrode dont l'influence sur les neurones étudiés ne peut être connue, même si son diamètre ne cesse de se réduire au fil des développements technologiques. De plus, même si la zone étudiée est globalement connue, il est impossible de connaître exactement les cellules enregistrées par l'électrode, à moins de disséquer l'échantillon après l'enregistrement, et ces neurones sont en général en assez petit nombre.

Cette technique est en constante évolution et voit régulièrement de nouvelles avancées repousser ses limites : à titre d'exemple, on peut citer des matrices d'*électrodes-aiguilles* très fines permettant d'observer une zone en 3D [5], qui permet d'augmenter drastiquement le nombre de neurones enregistrés tout en minimisant le caractère invasif des mesures.

Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) L'IRMf donne accès à des enregistrements de l'activité cérébrale à l'échelle d'un cerveau humain dans son ensemble, soit 4 ou 5 ordres de grandeur de plus qu'avec les enregistrements réalisés en électrophysiologie. Son fonctionnement repose sur le couplage neurovasculaire, c'est-à-dire les variations d'oxygénation du sang à proximité des zones cérébrales actives. De plus, l'IRMf peut être couplée avec l'IRM classique afin de relier les zones d'activité à des régions identifiées du cerveau. Cette technique d'enregistrement est utilisable sur l'homme et a permis une analyse en termes de zones d'acti-

tivité cérébrale pour un large panel de tâches ou de stimulations. Cependant, le prix à payer pour ces mesures à grande échelle est une résolution spatiale de l'ordre du mm^3 au mieux, accompagnée d'une fréquence d'acquisition limitée à 1 image toutes les 2 secondes.

Les deux techniques présentées ci-dessus permettent donc d'obtenir soit des mesures très précises d'une infime partie du système nerveux, soit des enregistrements de zones cérébrales d'une taille très supérieure à celle du neurone. Depuis bientôt trente ans, une nouvelle méthode d'enregistrement de l'activité cérébrale cherche à concilier les avantages de ces deux procédés de mesure : l'imagerie calcique [6].

Imagerie calcique Le principe de cette technique d'imagerie est le suivi optique de la fluorescence de *rapporteurs calciques*, molécules fluorescentes dont l'efficacité quantique ou les longueurs d'ondes d'émission/excitation dépendent de la concentration d'ions Ca^{2+} à l'intérieur des cellules du système nerveux. Lorsque la dépolarisation de la membrane augmente suffisamment sous l'effet de potentiels gradués (le potentiel de membrane dépasse alors une valeur seuil qui est souvent autour de -50 mV), les canaux calciques s'ouvrent et laissent entrer des ions calcium dans la cellule, ce qui se traduit par une la fluorescence du rapporteur.

Ces ions calcium, contrairement aux ions Na^+ ou K^+ qui sont responsables de la dépolarisation des neurones et dont la concentration est élevée dans le milieu intra-cellulaire (140 mM pour K^+ et 12 mM pour Na^+), sont présents à de très faibles concentrations lorsque la cellule est au repos (entre 50 et 100 nM), mais le passage d'un potentiel d'action multiplie celle-ci par un facteur 10 à 100 [7], tandis que la concentration des autres ions varie très peu. Cela justifie le choix des ions Ca^{2+} comme rapporteurs privilégiés des potentiels d'actions : si la fluorescence est proportionnelle à la concentration d'ions calcium dans le cytoplasme d'un neurone, le nombre de photons collectés lors d'un train de potentiels d'action sera facilement détectable [8] [9].

Deux types de rapporteurs calciques ont été développés : les *rapporteurs synthétiques* et les *rapporteurs génétiquement encodés* (GECI). Les premiers doivent être injectés dans chaque échantillon par l'utilisateur. Leurs temps de montée et de descente du signal de fluorescence sont courts et nécessitent donc une fréquence d'acquisition élevée (condition que toutes les caméras utilisées ne peuvent pas remplir). Par ailleurs, il est impossible de contrôler précisément la diffusion du rapporteur à partir du point d'injection, et la répartition est rarement homogène. Enfin, la durée d'utilisation du rappor-

teur n'est que de quelques heures, durée au-delà de laquelle la concentration devient trop réduite pour produire un signal de fluorescence exploitable. Les rapporteurs génétiquement encodés, malgré des temps de montée et de descente plus longs, ce qui n'est pas nécessairement un désavantage au vu des fréquences d'acquisition de la majorité des caméras, ne sont pas affectés par les autres défauts des rapporteurs synthétiques, et sont directement exprimés par les organismes génétiquement modifiés au sein des populations de neurones choisies (selon le gène sélectionné).

2.1.2 Rapporteur calcique utilisé : GCaMP6f

GCaMP est une famille de rapporteurs calciques composés d'une molécule de cpEGFP, une protéine fluorescente verte modifiée pour qu'elle se replie circulairement sur elle-même, liée à une molécule de calmoduline (CaM) ainsi qu'à un peptide synthétique M13 [10]. La cpEGFP est, même en l'absence d'ions calcium, fluorescente avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 515 nm. La calmoduline, quant à elle, est présente naturellement dans le cytoplasme des neurones, pour lesquels elle joue le rôle de signalisateur lorsque les ions Ca^{2+} entrent dans la cellule. Pour cela, elle peut capter jusqu'à 4 ions calcium. La fixation d'ions calcium sur CaM induit un changement de la conformation du peptide M13, qui à son tour change la conformation de la protéine cpEGFP, ce qui accroît son efficacité quantique, donc sa fluorescence (voir fig. ?? - a).

Plusieurs générations de GCaMP ont vu le jour, ce qui a permis de créer des sondes calciques avec des rapports signal sur bruit ou des temps de montée et de descente différents. Par exemple, selon le type d'imagerie (voir *Dispositifs d'observation en imagerie calcique*) et la fréquence d'acquisition d'images choisie, l'utilisateur de sondes GCaMP6 peut choisir entre 3 types de rapporteurs, chacun ayant des temps de descente différents : pour GCaMP6f (f pour *fast*) ce temps de descente est inférieur à la seconde, tandis que GCaMP6s (s pour *slow*) voit son signal de fluorescence décroître sur près de 3 secondes (cf fig. ?? - b).

Le rapporteur calcique utilisé dans les expériences présentées dans cette thèse est GCaMP6, développé par Loren L. Looger [11]. Les caractéristiques du signal de fluorescence d'un rapporteur calcique sont essentiellement l'augmentation relative de ce signal ($\Delta F/F$) lors d'un train de potentiels d'action, et les temps de montée et de descente de cette augmentation. Pour GCaMP6f, ce temps de montée est de 100 ms et le temps de descente d'environ 600 ms. Le $\Delta F/F$ provoqué par le passage d'un potentiel d'action est supérieur à 0.25 (voir fig. ?? - a).

2.1.3 Dispositifs d'observation en imagerie calcique

Microscope confocal Le fonctionnement de ce microscope repose sur l'utilisation d'un *sténopé* (*pinhole* en anglais), un trou très étroit ne laissant passer que la lumière issue du point focal (conjugué du point focal objet de l'objectif), mais pas des autres points de l'échantillon illuminé (cf. fig. ?? - a). A chaque instant, seule la lumière issue d'un seul point de l'échantillon est collectée et il est donc nécessaire de déplacer l'ensemble {illumination + sténopé + branche d'observation} pour accéder à la fluorescence issue du reste de l'échantillon.

Microscope à 2 photons Ce microscope utilise la fluorescence issue de l'absorption de deux photons par les molécules fluorescentes, au lieu d'un seul dans la fluorescence standard à l'œuvre dans les microscope confocaux, par exemple [12]. Ce processus d'excitation non linéaire nécessite une densité de photons importante pour exciter la protéine fluorescente utilisée. C'est précisément ce qui permet à la microscopie à 2 photons de se passer de sténopé (cf. fig. ??) : le flux de photons ne sera assez importante pour provoquer la fluorescence que là où le faisceau issu de la source est focalisé, c'est à dire au point focal de l'objectif. Dans ce dispositif, c'est donc par l'illumination, et non par la collection, que s'opère le sectionnement optique. Par ailleurs, les longueurs d'ondes utilisées permettent une meilleure pénétration dans les tissus biologiques [13]. Comme pour l'imagerie confocale, l'acquisition d'image se fait toujours point par point, ce qui limite la fréquence d'acquisition à moins de réduire le nombre de pixels composant la zone imagée.

Ainsi, pour le microscope confocal comme pour le microscope à 2 photons, un compromis doit être trouvé entre la taille de la région observée et la fréquence d'acquisition. Dans le cadre de la neuroimagerie fonctionnelle, cela oblige, pour appréhender ces réseaux étendus, à fixer une fréquence d'acquisition qui tôt ou tard ne suffira plus à mesurer les variations de fluorescence aux échelles temporelles voulues.

En effet, pour le microscope confocal comme en microscopie à deux photons, la fréquence d'acquisition f_{acq} est actuellement limitée par le temps d'exposition τ_{exp} via la relation :

$$f_{acq}N = \frac{1}{\tau_{exp}}$$

où N est le nombre de points observés sur chaque image. τ_{exp} doit être supérieur ou égal à $1\mu s$ pour que suffisamment de photons soient capturés, ce qui oblige l'utilisateur à restreindre la zone d'intérêt pour augmenter la fréquence d'acquisition.

Malgré toutes les évolutions apportées à ces types de microscopes [14] [15] [16], un nouveau dispositif d'imagerie calcique plus à même de faire face aux enjeux proposés par la neuroimagerie fonctionnelle a vu le jour il y a un peu moins de 10 ans.

Imagerie calcique par nappe laser

Le principe de l'imagerie par nappe laser est l'illumination par un plan de lumière, généralement obtenue en scannant rapidement un faisceau laser peu collimaté (digital light-sheet), arrivant sur le côté de l'échantillon. Ce plan, qui constitue la *nappe laser*, assure le sectionnement optique nécessaire à l'imagerie calcique. De la sorte, l'illumination et l'observation se font sur un plan et non plus point par point. La fréquence d'acquisition et la taille de la zone observée sont désormais indépendantes l'une de l'autre, et sont seulement tributaire du matériel utilisé. De fait, pour la nappe laser, la relation entre fréquence d'acquisition et temps d'exposition s'écrit :

$$f_{acq} = \frac{1}{\tau_{exp}}$$

et est indépendante du nombre de points observés. Le récent développement de caméras sCMOS à grand champ et grande cadence d'acquisition permet de tirer partie de la zone étendue dans laquelle le sectionnement optique est efficace tout en assurant une bonne résolution temporelle. De plus, et c'est ce qui a initialement motivé les premières expériences utilisant la nappe laser dans un contexte biologique, seul le plan de l'échantillon observé est illuminé, ce qui réduit le photo-blanchiment et les effets de photo-toxicité au sein de l'échantillon.

Les premières utilisations de la nappe laser pour imager des objets biologiques par fluorescence remontent à 2004, lorsque Huisken *et al.* utilisent ce processus d'illumination pour observer l'ensemble des cellules musculaires (exprimant de la GFP) d'une larve de poisson Medaka [17], puis pour observer le développement d'un embryon de drosophile en prenant une image toutes les 5 minutes pendant 17 heures. La résolution atteinte est alors de 6 μm , pour un champ de 1.5 \times 0.9 mm. Puis, en 2008, Keller *et al.* appliquent cette technique au suivi du développement embryonnaire de la larve de poisson-zèbre [18] dont le génome a été modifié afin que ses cellules expriment toutes la protéine GFP. Avec une résolution de 1 μm , et des images d'une taille de 700 $\mu\text{m} \times$ 700 μm , il est possible de suivre l'évolution de l'intégralité des cellules composant l'embryon pendant plus de 24h, en modifiant l'altitude de la nappe afin d'obtenir une image en trois dimensions de l'échantillon. Le niveau de fluorescence ne diminue pas au cours de l'expérience, preuve que cette technique d'imagerie sauvegarde les qualités fluorescentes des sondes mieux que les microscopes confocaux et à 2 photons.

En 2008 toujours, paraît la première étude faisant état d'enregistrements de signaux neuronaux *ex-vivo* sur un organe excisé de souris dans lequel était injecté un rapporteur calcique synthétique, Oregon green BAPTA-1 [19]. En effet, du fait de la géométrie du système, l'imagerie par nappe laser est difficile à utiliser *in vivo* chez la majorité des espèces étudiées en neurobiologie : les tissus biologiques étant généralement opaques, trouver un angle d'illumination tout en pouvant observer la lumière émise à 90° s'avère en général très délicat. Un candidat s'est néanmoins imposé, regroupant les conditions requises en termes de taille et de morphologie pour devenir le premier vertébré dont la totalité du cerveau peut être étudié en imagerie fonctionnelle à l'aide d'une nappe laser.

2.1.4 L'imagerie calcique chez la larve de poisson-zèbre

La larve de poisson-zèbre s'est imposée depuis deux décennies comme un organisme modèle important pour la recherche en neurosciences. A l'origine, la majorité des études dont elle faisait l'objet portaient davantage sur le développement des vertébrés. En effet, de nombreux organes sont reconnaissables dès 24 heures après fertilisation, et la quasi-totalité de son corps est transparent (exception faite de quelques pigments, voir paragraphe suivant), ce qui autorise un suivi de son développement par microscopie. Depuis l'arrivée de sondes calciques efficaces accompagnées de microscopes permettant d'enregistrer les variations de fluorescence de ces rapporteurs, la communauté scientifique a également choisi d'utiliser la larve de poisson-zèbre pour des expériences d'imagerie fonctionnelle [20] [21] [22][23]. Pour cela, de nombreux mutants ont été développés afin de créer des lignées d'animaux exprimant des rapporteurs calciques, comme GCaMP, dans certaines populations de neurones. Par exemple, le promoteur HuC (*elavl3*) contrôle l'expression dans tous les neurones du système nerveux central, et des larves chez lesquelles GCaMP est sous contrôle de ce promoteur permettent le suivi de l'activité de l'ensemble du cerveau [24]. On note cette espèce HuC :GCaMP N où N identifie la génération de protéine GCaMP utilisée.

En particulier, les larves de la lignée *nacre* [25] présentent l'avantage de ne pas développer de pigments (voir figure ?? - a), à part ceux de la rétine. En croisant cette lignée avec des poissons exprimant des rapporteurs calciques dans les populations de neurones voulues, on obtient des individus totalement transparents, dont les neurones sont fluorescents et dont l'activité peut être suivie par les méthodes optiques présentées précédemment. C'est ce type de mutant, couplé avec HuC :GCaMP qui sera utilisé dans toute la suite de notre travail (voir figure ?? - b).

En 2013, M.Ahrens *et al.* [26] et l'équipe *Imagerie calcique et compor-*

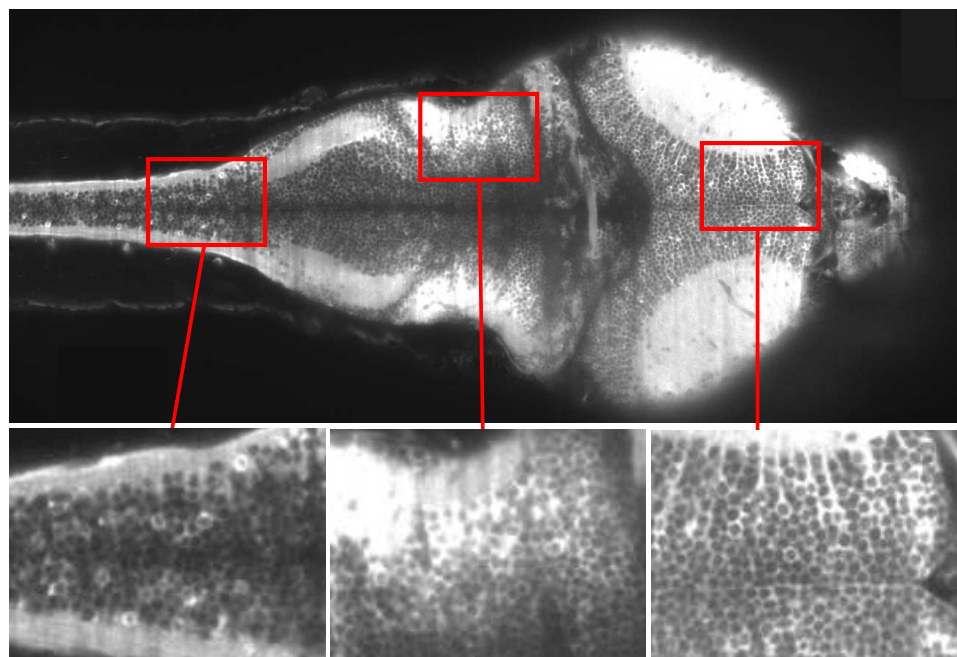


FIGURE 2.1: Image obtenue à l'aide du dispositif d'imagerie calcique par nappe laser pour une fréquence d'acquisition de 10 Hz. Sur les différentes fenêtres de zoom, on constate que la résolution spatiale est suffisante pour identifier correctement les neurones individuels. D'après [30]

tement du poisson zèbre du Laboratoire Jean Perrin [27] publient simultanément les premières images et les premières mesures tirant parti de la technique d'imagerie par nappe laser et de l'utilisation de larves de poisson-zèbre issues des lignées *nacre* et *HuC :GCaMP* (Schéma en figure 3.1). C'est la première fois que la totalité du cerveau d'un vertébré est observée en imagerie fonctionnelle avec une résolution suffisante pour accéder à l'activité des neurones individuellement (voir figure 2.1). Si le rôle de ces premières publications est surtout de décrire une nouvelle méthode d'imagerie et ses caractéristiques, d'autres études menées depuis ont montré que l'utilisation de la nappe laser permettait, en repoussant les limites rencontrées jusqu'ici en termes de résolution temporelle et de fenêtre d'observation, de franchir un palier dans la compréhension du système nerveux de la larve de poisson-zèbre [28] [29].

2.1.5 Perspectives

Depuis les premiers résultats obtenus à l'aide de la nappe laser, plusieurs équipes ont développé des améliorations de ce système d'observation, comme par exemple le light-sheet confocal dans lequel le faisceau scanné

est conjugué avec la zone d'ouverture de la caméra à chaque instant, augmentant ainsi la résolution axiale [31]. Par ailleurs, les améliorations du matériel à disposition (les caméras de plus en plus sensibles et rapides, notamment) laissent présager de nombreuses avancées dans la qualité et la quantité d'images enregistrées.

L'un des progrès les plus importants est à mettre à l'actif de S.Wolf *et al.* [32], qui ont adapté le principe de la microscopie à deux photons présentée ci-dessus au montage à nappe laser (prolongeant le travail de Truong *et al.* qui avaient déjà utilisé ce principe pour une description physiologique d'embryons de drosophile et de poisson-zèbre [33]), en excitant la fluorescence de GCaMP6f au moyen d'un laser infrarouge pulsé. En effet, la source de lumière servant à l'illumination de l'échantillon en régime monophotonique ayant une longueur d'onde de 488 nm, la larve de poisson-zèbre est, dans ce régime d'excitation mono-photonique, sans cesse stimulée visuellement par la nappe elle-même. Cette illumination intense dans le bleu représente un fond lumineux qui peut jouer un rôle sur la perception qu'ont les larves des stimulations visuelles qu'on leur présente, que ce soient des flashes ou des motifs défilants. Ainsi, ce montage de nappe laser avec illumination à deux photons permet de plonger les individus étudiés dans le noir (les larves de poisson-zèbre ne voient pas l'infrarouge [34]) pendant l'enregistrement des données, et d'analyser leurs réponses à des stimulations visuelles sans aucune perturbation par l'illumination.

Les perspectives offertes à la fois par les progrès technologiques et ce nouveau procédé d'illumination en infrarouge sont encourageantes à plusieurs points de vue : d'une part, les mesures seront de plus en plus précises, résolues en temps et permettront une compréhension toujours plus fine du système nerveux d'un organisme modèle pour les neurosciences. Parallèlement à cette évolution en termes de performances, le fait que l'illumination ne stimule plus le système visuel de la larve permet d'envisager de nombreuses expériences où d'autres modalités sensorielles seraient stimulées simultanément à la vision. Ainsi, on pourrait non seulement décrire avec une précision de l'ordre du neurone unique le fonctionnement de centres sensoriels (comme cela a été fait par électrophysiologie pour la rétine du chat, par exemple), mais également les interactions entre plusieurs de ces centres et les plus hauts niveaux d'intégration recevant des signaux d'autres modalités impliquées dans des prises de décision. Toutes ces zones cérébrales, des projections du premier ordre provenant des yeux ou de tout autre organe sensoriel aux centres d'intégration de plus haut niveau, peuvent être distantes de plusieurs centaines de microns, leur activité ne pouvait donc être enregistrée simultanément à l'aide des microscopes utilisés jusqu'ici. L'imagerie fonctionnelle par nappe laser permettra donc pour la première fois d'établir des corrélations entre les signaux enregistrés au sein de ces

différentes aires cérébrales malgré leur éloignement.

2.2 Expérience comportementale multimodale

En plus de toutes les qualités qui en ont fait un système modèle pour l'imagerie fonctionnelle, la facilité d'entretien de l'espèce *Danio Rerio* et sa grande fécondité permet de mettre en parallèle des études portant sur l'activité neuronale des larves avec des expériences de comportement impliquant un grand nombre d'individus, afin d'obtenir des résultats fiables du point de vue de la statistique. Cette partie présente les résultats d'une étude comportementale réalisée pendant ma première année de thèse, dont l'objectif était de comprendre les différentes réponses des larves de poisson-zèbre à une stimulation hydrodynamique en découplant les contributions de deux modalités sensorielles : la vision et la perception des écoulements par la ligne latérale.

2.2.1 Etat de l'art

En plus des qualités précédemment citées, la larve de poisson-zèbre se révèle un objet d'étude intéressant du point de vue comportemental en raison de la diversité de ses réponses présentées [35] [36], dès l'âge de 5 jours, à différents stimuli. Dans leur habitat naturel, à savoir l'eau peu profonde des rivières d'Inde, le principal comportement observé chez les larves de poisson-zèbre est la **rhéotaxie**, c'est-à-dire leur capacité à nager contre le courant afin de compenser le déplacement de l'eau. Ce comportement inné apparaît très tôt (ses prémisses peuvent être observés dès 4 jours après fertilisation) et devient rapidement un mouvement robuste et précis qui pourrait impliquer des circuits neuronaux complexes, et qui n'a pas encore été étudié en profondeur.

Parmi les réponses sensori-motrices les plus étudiées, le réflexe optomoteur (OMR pour Opto Motor Reflex) a déjà été largement caractérisé d'un point de vue comportemental [37] [38] [?], ainsi qu'à l'échelle neuronale [39] [40]. L'OMR déclenche des mouvements de nage discrets en réponse à des motifs en mouvement. A l'aide d'une boucle de rétroaction sensorimotrice efficace [23], les larves peuvent adapter la distance parcourue lors de chacun de leurs mouvements à la vitesse de déplacement de leur environnement et parviennent ainsi à rester plus ou moins stationnaires, même en étant plongées dans un paysage qui défile.

Même si l'OMR représente un excellent candidat pour expliquer ces mouvements de compensation de courant dont sont capables les larves de poisson-zèbre, au moins deux arguments suggèrent que ce comportement est également géré par au moins un autre processus sensorimoteur. Tout d'abord, si on se réfère à des expériences réalisées sur des poissons caver-

nicoles aveugles [41], [42], les larves devraient être capables d’appréhender leur environnement lorsqu’elles sont plongées dans le noir, donc sans aucune information visuelle. Le second argument plaide en faveur de contributions croisées de deux modalités : si, à la lumière, les larves utilisent les ombres sur le sol pour profiter de l’OMR et des réponses qu’il enclenche, l’information est toutefois incomplète puisque n’ayant pas accès à l’altitude à laquelle elles évoluent, elles n’ont accès qu’à une mesure angulaire de la vitesse de défilement des motifs.

Une modalité sensorielle de plus en plus étudiée chez la larve de poisson-zèbre, partagée avec tous les poissons et les batraciens, est la capacité à sentir les écoulements grâce à leur ligne latérale, un ensemble d’organes appelés *neuromastes* distribués sur toute la surface du corps de la larve (voir figure ??). Les neuromastes sont des excroissances distribuées sur le corps des poissons avec des motifs stéréotypés, assurant une transduction mécanique par l’intermédiaire de quelques cellules ciliées au sein des neuromastes. Il a été démontré que ces organes jouent un rôle lors des comportements de rhéotaxie, c’est-à-dire la réorientation des poissons dans le sens opposé au courant [43] [44] [45], ainsi que dans leurs mouvements de fuite [46] [47]. Il est également connu que la réponse de la ligne latérale des poissons adultes est liée à la vitesse de l’écoulement autour de l’animal [48] ou à l’amplitude d’une stimulation dipolaire [49]. Les neuromastes ont été décrits mécaniquement à l’aide de modèles élaborés par McHenry *et al.* [50] [51], faisant intervenir le couplage entre la cupule et l’eau pour calculer les réponses théoriques des neuromastes aux vibrations des particules d’eau environnantes.

D’un point de vue neurophysiologique, la ligne latérale de la larve de poisson-zèbre a été décrite à l’aide de nombreux marquages neuronaux [52] : en raison des similitudes entre les cellules ciliées humaines et les neuromastes, le développement de ces derniers a été beaucoup étudié [53] [54], ainsi que leur capacité de régénération qui les distingue des cellules ciliées de l’oreille humaine [55], et qui représente un domaine d’investigation très actif du fait de ses possibles retombées médicales. Les projections de ces neuromastes jusqu’aux ganglions de la ligne latérale, situés à l’avant (pour la ligne latérale *antérieure*, composée des neuromastes répartis sur la face de la larve) et à l’arrière (pour la ligne latérale *postérieure*, regroupant les neuromastes répartis le long de la queue) de l’oreille ont également été décrits à plusieurs reprises, tant du point de vue développemental [56] que purement morphologique [57] [58] (voir Fig. ?? - A,B,C). Puis, ces ganglions projettent dans certaines parties du rhombencéphale, comme le *medial octavolateralis nucleus* ou MON, et le *dorsal octavolateralis nucleus* ou DON, noyaux où projette le 8ème nerf qui regroupe les fibres nerveuses issues des ganglions de la ligne latérale ainsi que de l’organe auditif [59] [60] [56]. Finalement, ces zones cérébrales sont supposées, chez les poissons en général, communiquer avec

le *torus semicircularis*, une zone du mésencéphale qui elle-même projette dans le *thalamus*, région impliquée dans les prises de décision à partir de contributions de plusieurs organes sensoriels [61].

Cependant, le peu d'études qui font état d'enregistrements de l'activité neuronale des neuromastes ou des cellules des ganglions de la ligne latérale présentent des mesures par électrophysiologie [56] [62]. Malgré les récents progrès évoqués ci-dessus dans le domaine de l'imagerie calcique, ces méthodes d'observation n'ont pas encore été couplées à des stimulations hydrodynamiques de la ligne latérale, ce qui a motivé l'expérience de comportement décrite ci-après, préliminaire à de futures investigations sur les dynamiques à l'œuvre dans les réseaux neuronaux décrits par la littérature. En effet, le dispositif d'imagerie par nappe laser permettrait pour la première fois d'enregistrer simultanément l'activité dans les différentes régions cérébrales relayant successivement l'information captée par la ligne latérale.

2.2.2 Origine du dispositif et description du système

Dispositif développé par J.Olszweski

Les premières expériences réalisées au Laboratoire Jean Perrin sur la rhéotaxie se déroulaient dans un canal droit où était envoyé un courant de débit réglable, dans lesquels les larves évoluaient en compensant le courant par de courts mouvements de nage. Cependant ce système présentait des défauts, en particulier les vitesses ressenties par les larves étaient toujours les mêmes, et la compacité du système rendait une analyse à grand nombre d'individus compliquée tout en laissant trop souvent des individus s'échapper de la région filmée. A la lecture de l'article de J.Olszweski et de J.Liao [47], il nous est venu l'idée qu'un système avec un point de succion plutôt qu'un canal était plus adapté à notre problème. En effet, la vitesse ressentie par les larves à une distance r du point de succion évolue selon la loi $v(d) \sim \frac{Q_V}{d}$ où Q_V représente le débit volumique imposé par l'expérience. Ainsi, les larves subissent une vitesse variable au cours du temps, et les résultats après analyse tiennent donc compte d'une plus grande gamme de stimulations ressenties par les individus étudiés. La figure ?? présente le dispositif mis au point par l'équipe de J.Liao. Les larves de poisson-zèbres sont contenues dans un récipient au fond duquel un trou relié à une pompe à vide crée une aspiration. Elles sont ainsi aspirées et, dans le cas où elles parviennent à échapper à la succion, leur trajectoire est analysée afin d'enregistrer la distance à laquelle elles ont initié leur mouvement de nage et la vitesse atteinte pendant cette nage. L'analyse provient de films enregistrés à une fréquence de 60 Hz.

Les résultats présentés par Olszewski et al. ont mis en évidence le rôle joué par la ligne latérale dans les mouvements d'échappement effectués par les larves lorsqu'elles sont aspirées. En effet, après traitement des neuromastes à la néomycine, le pourcentage de larves parvenant à éviter une aspiration décroît fortement (cf. figure ??). Cependant, ces résultats ne donnent pas une mesure fine des mouvements de nage des larves, et ne prennent pas en compte l'impact de la modalité visuelle sur leur comportement lorsqu'elles sont soumises à une aspiration.

Nous avons donc réalisé un dispositif s'inspirant largement de celui présenté ci-dessus, mais en y apportant toutefois quelques modifications afin de pouvoir travailler sur une masse de données plus conséquente (L'article de Olszewski *et al.* présente des statistiques sur 98 larves, tandis que notre étude porte sur plus de 4000 trajectoires de nage).

Modifications apportées au dispositif

Le schéma du dispositif peut être observé en page 11 de l'article ci-après. Il s'organise globalement de la même manière que celui d'Olszewski et al., avec néanmoins quelques changements :

Fréquence d'acquisition Les images sont enregistrées à environ 250 Hz, ce qui permet d'accéder à une bien meilleure description des mouvements de queue des larves, et ainsi d'obtenir davantage d'informations sur leur comportement (figure 1-C de l'article ci-après).

Obscurité Le dispositif est contenu dans une boîte hermétique à la lumière, qui peut être ouverte ou fermée pour permettre ou non aux larves d'utiliser des informations visuelles. La caméra utilisée est sensible à la lumière infrarouge et l'ensemble de la zone filmée est éclairée par des lampes infrarouges. Il est donc possible de comparer le comportement des larves lorsqu'elles peuvent se servir de la vision et de la ligne latérale, ou lorsqu'elles sont privées de l'une des deux modalités. À noter que dans notre protocole, l'ablation chimique des neuromastes est réalisée à l'aide de sulfate de cuivre, connu pour endommager les cellules ciliées de la ligne latérale [63].

Nombre d'individus Un très grand nombre d'individus est présent dans la cuve où se déroulent les stimulations, et les larves à proximité du point d'aspiration n'y restent pas d'une stimulation à la suivante, car l'eau aspirée pour attirer les larves est ensuite réinjectée (afin de conserver une profondeur constante au fil de l'expérience) par un tube secondaire placé en dehors de la zone d'intérêt, créant un écoulement très turbulent dans toute la cuve.

L'ensemble de l'expérience est automatisé à l'aide d'un script Sikuli et d'un programme LabVIEW commandant la pompe péristaltique connectée

au tube d'aspiration. Cette source de débit réglable permet d'imposer des débits très variables (de 4 à 44 mL/min) et donc de soumettre les larves à des stimulations très différentes. Pour éviter les saccades liées à l'utilisation d'une telle pompe, des ballastes assurent un amortissement assez efficace pour que l'aspiration soit continue dans la cuve, en sortie du point de suction. Le principal avantage du dispositif réside dans l'automatisation des expériences : 9 valeurs du débit de la pompe péristaltique peuvent être choisies, de 10% à 90% du débit maximum de la pompe. Chaque débit est sélectionné 10 fois, et l'ordre des stimulations est aléatoire afin d'éviter toute habitude des larves. Ainsi, même si aucune larve n'est parfois présente dans la ROI, le grand nombre d'occurrences de chaque stimulation permet d'obtenir des observations suffisamment nombreuses pour pouvoir dégager des statistiques nouvelles sur certains motifs de la nage des larves.

2.3 Article

L'article présenté ci-dessous présente les résultats obtenus avec ce dispositif. Du point de vue du traitement des informations multi-sensorielles, il apparaît que lorsque l'animal dispose des deux informations, visuelle et hydrodynamique, son comportement se cale exactement sur le comportement observé avec uniquement l'une ou l'autre des modalités : l'initiation de la séquence de compensation, qui marque une transition avec la nage libre de l'individu, est dominée par la ligne latérale alors que les mouvements effectués lors de la séquence de compensation elle-même sont dominés par le système visuel. Le fait qu'une modalité domine ainsi l'autre écarte tout mécanisme de mise en commun des informations dans la prise de décision ou la régulation de la tâche de compensation de l'écoulement. Cela ne signifie pas qu'une fusion des informations sensorielles n'intervient pas dans d'autres tâches sensori-motrices ni à un stade de développement ultérieur, mais dans le cadre de notre expérience cela nous a empêché de tester de modèles intégratifs, comme par exemple les modèles d'inférence Bayésienne [64].

Notre expérience a toutefois permis de mettre en évidence des effets non-triviaux. Tout d'abord le fait que la réorientation passive, liée à l'hydrodynamique d'un objet allongé dans un écoulement, n'ait aucun effet ni dans la phase de nage libre ni dans la phase de nage à contre courant suggère que pendant ces deux phases les larves ont un processus actif de régulation de leur orientation : pendant la nage libre elles cherchent à diversifier au maximum leurs orientations par des réorientations fréquentes et aléatoires, alors que pendant la nage à contre courant elles se calent sur la direction locale de l'écoulement, c'est-à-dire l'axe radial dans notre géométrie. Notre expérience ne permet pas de conclure si, lors de la nage libre, les larves ont une réorientation aléatoire plus intense avec ou sans l'écoulement. Cet aspect mériterait dans doute des expériences supplémentaires, où la phase de nage libre est enregistrée pendant un temps suffisamment long avant le début de l'écoulement.

Ensuite, nous montrons que le premier évènement de nage (*swim bout*) a lieu à une position radiale moyenne qui ne dépend pas du débit d'aspiration, et ce, quel que soient les conditions sensorielles. Logiquement, la vitesse de dérive à laquelle a lieu ce mouvement croît linéairement avec le débit d'aspiration. Cela signifie qu'aucune quantité instantanée (vitesse, accélération, taux de cisaillement, etc.) ne peut expliquer l'initiation des séquences de nage à contre courant. Nous proposons donc que le déclenchement de ces séquences soit le fruit d'une intégration temporelle sur l'une ou l'autre des modalités sensorielles. Comme toutes les quantités instantanées augmentent non linéairement (vitesse en q/r , accélération en q/r^3 , etc.), leurs intégrales

divergent très rapidement et tout seuil sur une quantité intégrée donnera un résultat qui ne dépend que faiblement de la condition initiale ou du débit volumique q .

Enfin, en analysant finement les motifs de nage nous mettons en évidence les différences entre les régulations sensorimotrices reposant sur le système visuel ou sur la ligne latérale. Dans le cas de la ligne latérale, la régulation est obtenue par répulsion/attraction autour d'un point de fonctionnement (physiquement un arc de cercle autour du point de succion) alors qu'avec le système visuel, il y a de la répulsion à proximité du point de succion et, au delà d'une distance seuil, une compensation efficace à n'importe quelle distance. L'analyse des motifs de nage à différents âges nous a aussi permis de constater que, alors même que la distance inter-*bout* moyenne reste nulle, indiquant que la tâche de maintien à une position donnée est bien réalisée, le nombre de battements de queue par évènement de nage décroît en moyenne entre 5 et 9 jours après fertilisation. Cela est directement compensé par une augmentation de la courbure moyenne lorsque le système visuel est actif, et par une diminution de la période inter-*bout* lorsque seule la ligne latérale est active.

Ces différents résultats appellent de nouvelles analyses, cette fois au niveau neuronal, pour comprendre ces effets à un niveau plus fondamental.

Rheotaxis of larval zebrafish: behavioral study of a multi-sensory process

Raphaël Olive¹, Sébastien Wolf¹, Alexis Dubreuil¹, Volker Bormuth¹,
Georges Debrégeas¹ and Raphaël Candelier^{1,*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS 8237, Laboratoire Jean Perrin, 75005, Paris, France

Correspondence*:

Raphaël Candelier

Laboratoire Jean Perrin, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, Paris, 75005, France, raphael.candelier@upmc.fr

2 ABSTRACT

3

4 Awake animals unceasingly perceive sensory inputs with great variability of nature and intensity,
5 and understanding how the nervous system manages this continuous flow of diverse information
6 to get a coherent representation of the environment is arguably a central question in systems
7 neuroscience. Rheotaxis, the ability shared by most aquatic species to orient towards a current
8 and swim to hold position, is an innate and robust multi-sensory behavior that is known to
9 involve the lateral line and visual systems. To facilitate the neurothological study of rheotactic
10 behavior in larval zerbafish we developed an assay for freely swimming larvae that allows for
11 high experimental throughput, large statistic and a fine description of the behavior. We show that
12 there exist a clear transition from free-swim to counterflow swim, and by changing the sensory
13 modalities accessible to the fishes (visual only, lateral line only or both) and comparing the swim
14 patterns at different ages we were able to detect and characterize two different mechanisms
15 for position holding, one mediated by the lateral line and one mediated by the visual system.
16 We also found that when both sensory modalities are accessible the visual system completely
17 overshadows the lateral line, suggesting that at the larval stage the sensory inputs are not merged
18 to finely tune the behavior but more that redundant information pathways are used as functional
19 fallbacks.

20 **Keywords:** zebrafish, rheotaxis, behavior, vision, lateral line, multi-sensory integration

1 INTRODUCTION

21 Positive rheotaxis is the innate behavior shared by most fishes and amphibians to turn to face into an
22 oncoming current, and hold position with minimum expenditure of energy (Arnold and Weihs, 1977).
23 The term *rheotaxis* actually encompasses two distinct behavioral phases, namely orientation of the body
24 along stream lines and counterflow swim to hold position. Position holding is often considered to rely on
25 the sole visual system and in particular on the so-called optomotor response (Orger et al., 2000, 2008;
26 Portugues and Engert, 2009). Regarding body orientation, it has been considered for a long time that
27 it could not originate from hydromechanical cues based on the false assumption that it may occur even

28 without relative motion between the fish and its surrounding medium (Lyon, 1904; Arnold, 1974). Such
29 conditions are almost impossible to reach in real situations, as there are always velocity gradients created
30 by walls, obstacles, sheared flows or turbulence and it has been shown that superficial neuromasts mediate
31 the body reorientation behavior (Montgomery et al., 1997), even in the absence of visual cues (Baker and
32 Montgomery, 1999). Most subsequent studies then considered that the lateral line is the dominant sensory
33 system in controlling body orientation (Chagnaud et al., 2007; Olszewski et al., 2012; Suli et al., 2012).

34 This categorization – the lateral line mediates body orientation and the optomotor response mediates
35 counterflow swim – is however too simplistic to explain the rich behavior of aquatic species. For instance
36 there are evidences that visual (Suli et al., 2012) or olfactory (Baker and Montgomery, 1999) cues help
37 fishes to orient themselves and that some fishes deprived of both visual and hydromechanical cues can still
38 perform rheotaxis (Van Trump and McHenry, 2013), supposedly by means of tactile perception. The whole
39 rheotaxis process should thus be regarded as a truly multisensory task (Bak-Coleman and Coombs, 2014)
40 and it remains to elucidate if there is either a dominant modality (that may change across species or during
41 development) or a smart processing of multi-sensory information such as Bayesian inference (Pouget et al.,
42 2013).

43 Here, we investigate the rheotactic behavior of freely-swimming larval zebrafish in a radial flow assay.
44 This vertebrate model presents a number of advantages for studying the neural basis of behavior (Portugues
45 and Engert, 2009) and, in particular, its translucency and ease for genetic manipulation allows for non-
46 invasive imaging of brain-wide neural activity (Orger et al., 2008; Ahr, 2013; Panier et al., 2013). We tracked
47 thousands of larvae in different sensory conditions (with or without light, with or without hydromechanical
48 cues) and categorized the discrete bouts in sequences of free swim and counterflow swim. The counterflow
49 swim sequences (CSS) showed clear position holding relative to the suction point, both angularly and
50 radially, when visual or hydromechanical cues could be exploited. We observed that the position holding
51 mechanism is different when the larva has access to only visual or only hydromechanical cues and that,
52 except for the CSS initiation where the lateral line system allows for earlier triggering, the visual system is
53 the dominant modality in shaping the swimming patterns during CSS.

2 RESULTS

54 2.1 Rheotaxis assay

55 To study rheotaxis in freely swimming larval zebrafish we used the radial flow geometry proposed
56 in Olszewski et al. (2012) in an assay allowing for high experimental throughput. Clutches of tenths of
57 wild-type larvae from 5 to 9 days post fertilization (dpf) were placed in the assay and cycles of aspiration
58 from a suction point and water reinjection were applied (**Figure 1A,B**). Among the numerous larvae, only
59 the few lying in the field of view at the center of the assay were imaged during the suction phase by a high
60 speed camera at 250 Hz. Several different flow rates ranging on a decade were applied with a cycle-to-cycle
61 randomization. The reinjection flow randomly reset the positions of the larvae in the assay at each cycle,
62 ensuring a renewal of the population lying in the field of view. During *a posteriori* image processing the
63 larvae were individually tracked and image moments were used to extract body curvatures and define swim
64 bouts (see **Methods, Figure 1C** and **Supplementary Video 1**).

65 The larvae showed robust positive rheotaxis, *i.e.* alignment towards the flow and counterflow swimming
66 in the form of sequences of bouts. With 52 clutches submitted to 90 cycles each, we recorded 4,082
67 trajectories and identified 2,409 CSS comprising a total of 17,964 swim bouts. All trajectories that lasted
68 more than 10 seconds showed a CSS. In order to tune the sensory information available to the larvae, half of

69 them were chemically treated with CuSO_4 to inactivate the lateral line (see **Methods**) and, independently,
70 half the experiments were performed in the dark, thus leading to four different sensory conditions.

71 **2.2 Transition from free-swim to counterflow swim**

72 In the absence of visual and hydrodynamic cues, the larvae passively drifted towards the suction
73 point (**Figure 3A**), with sometimes brusque, oversized and non-oriented escape bouts, indicating that
74 the remaining sensory systems (proprioceptive and vestibular systems for instance) can trigger escape
75 responses but are unable to generate CSS behavior on their own. All other sensory conditions showed CSS
76 (**Supplementary Video 2**).

77 As the angle α between the body axis and the local stream lines determines the efficiency of each impulse
78 to compensate the flow, it is a key parameter of counterflow swim. We observed a clear transition from
79 initial free-swim behavior for which α is uniformly distributed to CSS with peaked distribution of α
80 (**Figure 2A**). Alignment along the stream lines can be achieved either actively during swim bouts, or simply
81 passively because of the *Jeffery effect*: hydrodynamic computations show that elongated objects in sheared
82 flows experience torque (Jeffery, 1922; Dhont and Briels, 2005) which, in our geometry, tends to align the
83 larvae radially on a time scale that depends on the flow rate and the initial position (radius and angle) of the
84 larva (**Supplementary Figure [#]**). We computed the circular variance of α in time bins of 0.5 s ranging
85 from 10 s before to 10 s after the onset of the CSS (**Figure 2B**), and compared it with the circular variance
86 of simulated passive trajectories (see **Methods**). During the free-swim phase the circular variance was close
87 to 1, the theoretical value for a uniform angular distribution. Notably, the circular variance did not decrease
88 with time, suggesting that the larvae actively explored their angular space at a pace that is sufficient to
89 neutralize the effect of passive orientation. During the CSS the circular variance immediately dropped to
90 an asymptotical value close to 0, the theoretical value for perfect alignment. Quasi-radial orientation was
91 achieved in one single bout for the three sensory conditions. For all later bouts, the distributions of body
92 angles at the bout onset were slightly more peaked than at the bout offset, most likely due to the passive
93 orientation occurring during inter-bout delays (**Figure 2C**).

94 **2.3 Initiation and regulation of counterflow swimming sequences**

95 To evaluate which hydromechanical cues are determinant in the initiation of CSS in larval zebrafish, we
96 compared the average radial position ρ_1 and average velocity v_1 at the onset of CSS as functions of the
97 suction flow rate (**Figure 3B**). For all sensory condition, the radial position was found to be independent of
98 the flow rate, the velocity had a linear dependence and the acceleration a parabolic dependence (not shown).
99 We checked that the distributions of ρ_1 are different from random positions in the field of view (two-sample
100 Kolmogorov-Smirnov test, $p < 10^{-10}$ in all three sensory conditions), while the distributions of angular
101 positions θ_1 could not be significantly differentiated from uniform randomness (two-sample Kolmogorov-
102 Smirnov test, $p > 10^{-3}$ in all three sensory conditions). Notably, the average ρ_1 were significantly lower
103 when the fish relied on its sole visual system than when it could use its lateral line (Welch's t-test, $p > 0.9$
104 for lateral line only compared to both sensory input, $p < 10^{-10}$ otherwise) and, coherently, the average v_1
105 were higher. In our paradigm where the fish is driven towards the suction point it means that the lateral line
106 allows for an earlier initiation of the CSS behavior than the visual system. With both sensory modalities,
107 the radii at which CSS initiates are undistinguishable from those of the lateral line only condition, so the
108 lateral line can be considered as the dominant sensory system.

109 After CSS initiation, the distributions of difference in angular position θ between the bouts' onsets and
110 offsets were found Gaussian with large standard deviations (15.4° with lateral line only, 18.6° with vision

111 only and 8.4° with both), indicating that in the course of a trajectory the position in the laboratory frame
112 (ρ, θ) is not fixed while relative position with respect to the suction point (ρ, α) is held (**Figure 2A**). Though
113 the regulation of the body angle α during CSS appeared to be independent of the sensory condition, the
114 regulation of radial position ρ was found to rely on different mechanisms (**Figure 3C**). With the lateral line
115 only, the average inter-bout distance δ was positive close to the suction point (repulsion) and negative far
116 away (attraction), leading to a stabilization process around an operating point corresponding in the assay
117 to a circle of radius 8.7 mm around the suction point. With vision only, steep repulsion occurred below a
118 threshold at 5 mm, while above the threshold a plateau at $\delta=0$ indicated efficient radial position holding at
119 any distance from the suction point. With both sensory modalities, the fish behaves as with the sole visual
120 system.

121 The inter-bout distance δ is the result of a complex process involving the inter-bout period τ tuned by the
122 fish and the coupling between body movements and the surrounding medium resulting in bout impulses.
123 The impulse amplitude reads $m \cdot u$ where m is the mass of the larva and u is the impulse speed and depends
124 on the number n of tail beats, the beating period τ_b and tail curvature κ . The distributions of n , τ_b , $|\kappa|$, u ,
125 τ and δ are displayed on **Figure 3D** for the three sensory conditions, as well as the outcome of pairwise
126 two-sample Kolmogorov-Smirnov tests. It appeared that for all these quantities the distributions for the
127 lateral line only and for the visual system only were significantly different, and that the distributions for
128 fishes having both modalities were either very close or undistinguishable from the distributions of the
129 visual system only condition. The visual system thus appeared to be clearly dominant in controlling the
130 swimming patterns during CSS.

131 **2.4 Maturation of the lateral line and visual systems**

132 To quantify how the CSS evolved with the development of the sensory systems and the associated neural
133 circuits, we explored the same data according to the age of the larvae (**Figure 4**). For all sensory modalities
134 and at all age, the average inter-bout distance δ was close to zero, indicating than an efficient position
135 holding was always performed. However, how this net result was achieved evolved with age in a different
136 manner for the lateral line and the visual system. With the lateral line system only, the number of tail beats
137 per bout n decreased with age (**Figure 4A**) while the mean absolute tail curvature $|\kappa|$ and the tail beat
138 period τ_b remained constant (**Figure 4BC**). This resulted in a decreasing bout impulse speed u (**Figure 4D**),
139 which was compensated by a decrease of the inter-bout period τ (**Figure 4E**). With the visual system
140 only, the number of tail beats per bout also decreased (**Figure 4A**) but is was directly compensated by an
141 increase of the mean absolute curvature $|\kappa|$ (**Figure 4B**) and all other quantities (tail beat period, impulse
142 speed and inter-bout period) remained constant with age. When the fish had both sensory inputs, all the
143 measured quantities showed similar average values than for the visual system only.

3 DISCUSSION

144 We have developed an assay for studying rheotaxis of freely swimming zebrafish larvae in radial flow
145 geometry. The trajectories revealed two distinct swim phases: free swim, characterized by an active
146 exploration of the relative angular space, and CSS, characterized by an active locking onto the local
147 streamlines direction. The transition between the two swim phases was characterized by a clear and
148 instantaneous reorientation in all sensory conditions showing CSS and at all ages. Passive reorientation
149 was found to be a minor effect in both swim phases due to the rapid pace of the active bouts. The
150 hydromechanical stabilization around $\alpha=0$ nevertheless facilitated orientation locking during the CSS by
151 balancing the minute swerves of counterflow swim bouts.

152 The precise conditions that trigger the transition from free swim to counterflow swim are still to be
153 elucidated. We found it does not happen at a given flow speed or acceleration, but rather at a constant radial
154 position which depends on the available sensory cues. Our proposal is that the larva integrates drifting
155 information during passive aspiration in-between free swim bouts and initiates the CSS when a threshold is
156 reached. The lateral line may achieve earlier triggering because of its exquisite sensitivity, or because it
157 allows to probe instantaneously the drift state by computing velocity gradients over the body surface while
158 visual processing requires temporal integration.

159 Regarding position holding, two different mechanisms have been found. Though the net result is the same
160 – the fish maintains its position on average in all conditions and at all ages – the compensation mechanisms
161 are different. On one hand the visual system position holding is allowed at any distance from the suction
162 point provided it is further than a repulsion limit at ≈ 1.5 body lengths, and is adjusted during aging at
163 the level of the bout itself by the number of tail beats and the tail curvature. On another hand, lateral
164 line-mediated position holding relies on attraction and repulsion around an operating point and is tuned
165 during aging by both the average number of tail beats per bout and the inter-bout period.

166 Interestingly, the lateral line and visual systems proved to be dominant for distinct tasks. The lateral
167 line, which offers earliest flow recognition, controlled the CSS initiation radius. After CSS initiation, the
168 lateral line system was superseded by the visual system in all aspects of the rheotactic behavior, down to the
169 tail beat scale. The absence of intermediary behaviors rule out the possibility of Bayesian inference-like
170 processings (Pouget et al., 2013) in this age range. The fact that CSS are controlled by the visual system
171 does not mean that the lateral line does not play a role in position holding though: the lateral line may be
172 used as a fallback mechanism for position holding during night time or when the visual system is damaged.
173 Similarly, the visual system may trigger CSS in other flow geometries, *e.g.* with weak velocity gradients.

174 A closely related behavior is the escape response of small aquatic animals to predators using suction
175 feeding (Engeszer et al., 2007), as the animal has to orient along stream lines and swim away from the
176 predator. The ability to detect and avoid high velocity radial flows is critical for their survival, and is likely
177 to be a multisensory process sharing many similarities with rheotaxis in milder flows. Though it is possible
178 to simulate a predator strike in a linear flume (McHenry et al., 2009), the radial flow geometry is more
179 realistic and allows for high experimental throughput. It would be certainly of great interest to monitor and
180 characterize the transition between position holding and escape responses as the flow rate increases.

4 MATERIAL & METHODS

181 4.1 Fish maintenance and preparation

182 Zebrafish (*Danio Rerio*) embryos were obtained from natural spawning of AB wild-type lines. Larvae
183 where reared in Petri dishes on a 14/10 h light/dark cycle at 28°C. Eggs where kept in E3 solution with
184 $10^{-5}\%$ Methylene Blue before etching, and then in standard E3 solution. Larvae where fed powdered
185 nursery food every day from 4 to 9 days post-fertilization (dpf). In preliminary experiments we couldn't
186 observe any CSS for larvae younger than 5 dpf, so we used larvae from 5 to 9 dpf for the assay. All
187 experiments were carried out in accordance with approved guidelines and approved by *Le Comité d'Éthique*
188 *pour l'Expérimentation Animale Charles Darwin* (02601.01).

189 For experiments in which the lateral line was chemically ablated, larvae were bathed in 10 μM copper
190 sulfate (CuSO_4 , Sigma-Aldrich) during 2 hours and rinsed several times in E3. All the experiments where
191 then performed within 5 hours to ensure the neuromasts did not regenerate. We checked the ablation by

192 exposing treated larvae to 0.5 mM DASPEI solution (Sigma-Aldrich) for 40 minutes and observed the skin
193 with a fluorescence binocular. All neuromast sites showed no or extremely weak fluorescence as compared
194 to control larvae.

195 4.2 Assay

196 The assay consisted in a 150 mm-wide Petri dish (Sigma-Aldrich) containing 40 to 50 zebrafish larvae. A
197 0.9 mm-inner diameter needle (NN-2038S, Terumo) with a customly flattened and blunted tip was placed
198 horizontally close to the center of the container to generate the aspiration flow (**Figure 1A**). A rectangular
199 piece of transparent polymer (PMMA - 25×20×4 mm) lied in the field of view at the bottom of the Petri
200 dish to locally reduce the water depth down to 4 mm. The suction needle was tubed to a ballast tank, a
201 peristaltic pump (Ismatec IPC, Wertheim, Germany) and finally a reservoir tank filled with E3. The ballast
202 smoothed the jerky flow generated by the peristaltic pump at high flow rates and served as a storage tank for
203 larvae sucked during the experiment. Each experiment consisted in series of 90 suction/injection cycles. The
204 flow rate during the suction phase was randomly chosen among nine different values ranging linearly from
205 0.07 mL.s⁻¹ to 0.66 mL.s⁻¹. Suction phases lasted no more than 20 s, such that the water depth change
206 was neglectable even at the highest flow rate. During the injection phase, the same amount of water was
207 reinjected in the assay at 0.22 mL.s⁻¹. An electrovalve (LHDA0533115H, The Lee Company) redirected
208 the reinjected flow to a second syringue tip located far away from the suction point (**Figure 1B**). Orthoradial
209 reinjection created a circular flow in the Petri dish which tended to gather the larvae at the center, in the
210 field of view. A 10 s pause was marked between each reinjection and the next run to let the circular flow
211 vanish. Injections / reinjections cycles and camera acquisition were fully automatized and managed by a
212 custom set of programs using LabVIEW (National Instruments, Texas, USA), FlyCapture2 (Point Grey
213 Research, Richmond, BC, Canada) and Sikuli (User Interface Design Group, MIT, Massachusetts, USA).

214 A Flea3 USB3 Camera (Point Grey Research, Richmond, BC, Canada) with an adjustable macro lens
215 (Zoom 7000, Navitar, USA) recorded a 22×18 mm region of interest in the assay from above with a pixel
216 size of 35μm. Trajectories were recorded in free-running mode at an average framerate of 250 frames.s⁻¹
217 with pixel-encoded timestamps. A dark background was placed under the assay. Raking illumination of
218 the scene was performed with two high-power infra-red LEDs (850 nm, SFH 4750, Osram). An IR filter
219 (LS387111 LO, Goodfellow, Huntingdon, England) placed in front of the lens blocked all visible light. A
220 45° mirror was placed in the field of view (**Figure 1A**) to check that larvae where not touching the bottom
221 of the assay. Due to focus loss the mirrored images were too blurred to allow for precise extraction of the
222 vertical position of larvae.

223 4.3 Image processing

224 All data was analyzed using custom-written software in Matlab. On each image, larvae were detected by
225 (i) subtracting the run's average image, (ii) applying a Gaussian filter (175×175 μm box, $\sigma=50 \mu\text{m}$), (iii)
226 thresholding and filtering objects smaller than 500 pixels (approx. 50% of a larva).

227 To evaluate body curvature, we used an approach based on image moments inspired by the work of Rocha
228 et al. (2002) for tracking articulated objects. We evaluated the level-1 *BSP*-tree to obtain two equivalent
229 ellipses of the head and the tail of each larva at each time frame (**Figure 1C**). The body angle α was defined
230 as the angle between the major axis of the head ellipse and the radial direction. We then considered the
231 intersection of both ellipses' minor axes as the center of curvature and computed the radius of curvature R
232 as the average distance between the center of curvature and all larva's pixels. The curvature was defined
233 as $\kappa = 1/R$ and signed positively when the center of curvature was located on the right of the larva,

234 negatively otherwise. This quantity accurately described the swim tail beats, even at very low amplitude
235 (**Supplementary Movie 1**).

236 The larvae were then tracked among all images with the algorithm described in Crocker and Grier (1996)
237 with a maximal dispersion of 3.5 mm between two images and a memory of 100 time steps (400 ms). Swim
238 bouts were then located in the trajectories on the basis of the curvature traces. For each bout, the time at
239 which the radius $\rho(t)$ was minimal defined the impulse start t_k . The radial trace was then fitted on the
240 100 ms preceding the impulse by an affine function $\rho(t < t_k) = v_f t + c$ to extract the fluid velocity v_f ,
241 and on the 300 ms following the impulse by:

$$\rho(t > t_k) = \rho(t_k) + \lambda u \cos(\alpha)(1 - e^{-t/\lambda}) - v_f t \quad (1)$$

242 where u is the impulse velocity and λ is the Stoke's drag damping time scale. The latter can be written
243 $\lambda = k\mu/m$ where μ is the dynamic viscosity, m is the mass of the larva and k is a constant solely depending
244 on the geometry of the larva. The typical dimensions and mass of the larvae changed from 5 to 9 dpf
245 (**Supplementary figure [x]A**), but this did not affected the distribution of the fitted λ (Kolmogorov-Smirnov
246 test, [p-value?] for 5 and 9 dpf - **Supplementary figure [x]B**).

247 We used a custom graphical user interface to visualize the radial and angular trajectories, bouts and
248 fits. We used this interface to manually discard the trajectories too short, where the larva stucked to the
249 bottom of the assay or where multiple larvae contacted each other. Series of bouts with a clear motion away
250 from the suction source were defined as counterflow swimming sequences, and when a long time without
251 counterflow swim could be observed before the sequence the first bout was flagged.

252 **4.4 Data analysis**

253 The dispersion of an angular dsitribution. The circular variance of a set of angles α_k is defined as
254 $var_c(\alpha) = 1 - |\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\alpha_j}|$ and varies from 0 (all angles are similar) to 1 (angles compensate exactly, or
255 the distribution is uniform and N is large). We have checked that the standard deviation of the angular
256 distribution ...

257 ...

DISCLOSURE/CONFLICT-OF-INTEREST STATEMENT

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

260 R.O. designed and realized the experimental setup, performed the experiments and contributed to image
261 processing and data analysis. S.W. contributed to image analysis and animal tracking. A.D. and V.B.
262 contributed to data analysis. G.D. contributed to data analysis and article writing. R.C. designed the
263 experiment, analyzed data and wrote the article.

ACKNOWLEDGMENTS

264 We thank Iris Odsrcil and Florian Engert for fruitful discussion. We also thank the *Institut de Biologie*
265 *Paris Seine* (IPBS) and the UPMC fish facility for sharing their experience, manpower and support.

266 *Funding:* [Put something here. The post-doc work of A.D. was supported by ...].

REFERENCES

- 267 (????). Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy
- 268 Arnold, G. and Weihs, D. (1977). The Hydrodynamics of Rheotaxis in the Plaice (*Pleuronectes Platessa*
- 269 L.) . *J. Exp. Biol.* 75, 147–169
- 270 Arnold, G. P. (1974). Rheotropism in fishes. *Biological Reviews* 49, 515–576. doi:10.1111/j.1469-185X.
- 271 1974.tb01173.x
- 272 Bak-Coleman, J. and Coombs, S. (2014). Sedentary behavior as a factor in determining lateral line
- 273 contributions to rheotaxis. *The Journal of Experimental Biology* 217, 2338–2347. doi:10.1242/jeb.
- 274 102574
- 275 Baker, C. and Montgomery, J. (1999). The sensory basis of rheotaxis in the blind Mexican cave fish,
- 276 *Astyanax fasciatus*. *J. Comp. Physiol. A*, 519–527
- 277 Chagnaud, B. P., Hofmann, M. H., and Mogdans, J. (2007). Responses to dipole stimuli of anterior lateral
- 278 line nerve Wbres in goldWsh, *Carassius auratus*, under still and running water conditions. *J Comp*
- 279 *Physiol A* 193, 249–263
- 280 Crocker, J. and Grier, D. (1996). Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *J. Colloid*
- 281 *Interface Sci.* 179, 298
- 282 Dhont, J. K. G. and Briels, W. J. (2005). Rod-Like Brownian Particles in Shear Flow. In *Soft Matter,*
- 283 *Volume 2: Complex Colloidal Suspensions*, eds. G. Gompper and M. Schick (Wiley-VCH Verlag GmbH
- 284 & Co. KGaA), chap. 3.10-3.16
- 285 Engeszer, R., Patterson, L., Rao, A., and Parichy, D. (2007). Zebrafish in The Wild: A Review of
- 286 Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish* 4, 21–40. doi:10.1089/zeb.2006.9997. Doi:
- 287 10.1089/zeb.2006.9997
- 288 Jeffery, G. B. (1922). The Motion of Ellipsoidal Particles Immersed in a Viscous Fluid. *Proceedings of the*
- 289 *Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 1012, 161–179
- 290 Lyon, E. P. (1904). On rheotropism. I. — Rheotropism in fishes. *Am. J. Physiol.* 12, 149–161
- 291 McHenry, M. J., Feitl, K. E., Strother, J. A., and Van Trump, W. J. (2009). Larval zebrafish rapidly sense
- 292 the water flow of a predator's strike. *Biol. Lett.* 5, 477–479
- 293 Montgomery, J. C., Baker, C. F., and Carton, A. G. (1997). The lateral line can mediate rheotaxis in fish.
- 294 *Nature* 389, 960–963
- 295 Olszewski, J., Haehnel, M., Taguchi, M., and Liao, J. (2012). Zebrafish Larvae Exhibit Rheotaxis and Can
- 296 Escape a Continuous Suction Source Using Their Lateral Line. *Plos One* 7
- 297 Orger, M., Kampff, A., Severi, K., Bollmann, J., and Engert, F. (2008). Control of visually guided behavior
- 298 by distinct populations of spinal projection neurons. *Nature Neuroscience* 11, 327–333
- 299 Orger, M. B., Smear, M. C., Anstis, S. M., and Baier, H. (2000). Perception of Fourier and non-Fourier
- 300 motion by larval zebrafish. *Nature* 3, 1128–1133
- 301 Panier, T., Romano, S. A., Olive, R., Pietri, T., Sumbre, G., Candelier, R., et al. (2013). Fast functional
- 302 imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy.
- 303 *Frontiers in Neural Circuits* 7
- 304 Portugues, R. and Engert, F. (2009). The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish. *Current*
- 305 *Opinion in Neurobiology* 19, 1–4
- 306 Pouget, A., Beck, J., Ma, W., and Latham, P. (2013). Probabilistic brains: knowns and unknowns
- 307 Rocha, L., Velho, L., and Carvalho, P. C. (2002). Image Moments-Based Structured and Tracking of
- 308 Objects. In *Proceedings of the 15th Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*
- 309 Suli, A., Watson, G. M., Rubel, E. W., and Raible, D. W. (2012). Rheotaxis in Larval Zebrafish Is Mediated
- 310 by Lateral Line Mechanosensory Hair Cells. *Plos One* 7

- 311 Van Trump, W. J. and McHenry, M. J. (2013). The Lateral Line System is Not Necessary for Rheotaxis in
312 the Mexican Blind Cavefish (*Astyanax fasciatus*). *Integrative and Comparative Biology* 53, 799–809.
313 doi:10.1093/icb/ict064

FIGURES

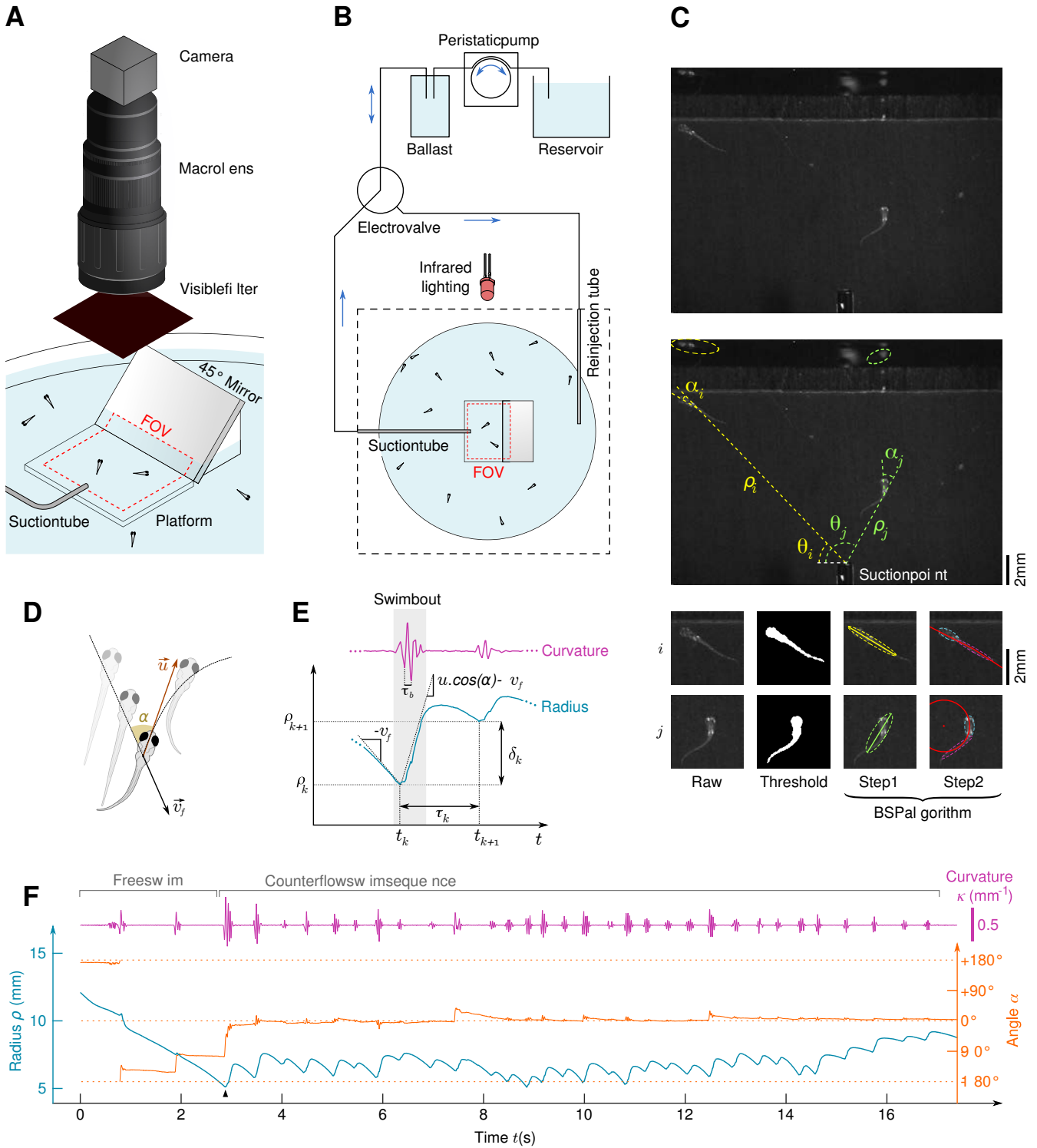


Figure 1. Behavioral response of freely swimming zebrafish larvae to a radial flow. (A) Schematic diagram of the rheotaxis assay. Zebrafish larvae are spread all across the pool and a thin tube creates a radial flow by aspiration. The field of view (FOV) is a rectangle in the center of the assay which comprises a platform that locally raises the ground and the bottom part of a 45° mirror. An infrared-sensitive camera continuously images the FOV at a framerate of 250 Hz. (B) Schematic view of the flow control system. The suction tube is connected to a ballast, a peristaltic pump and a reservoir. A computer-driven electrovalve allows to reinject water orthoradially to periodically randomize the larvae positions. (C) Illustration of the image processing algorithm. Raw greyscale images (*top*) are subtracted to a background image and thresholded to materialize binarized larvae bodies (*bottom left*), from which polar coordinates $(\rho(t), \theta(t))$ are derived (*center*). A BSP tree (*bottom-right*) is used to obtain the equivalent ellipses of the head and tail and thus define the body angle $\alpha(t)$ and body curvature $\kappa(t)$. (D) Scheme defining the fluid velocity \vec{v}_f and the bout impulse speed \vec{u} . (E) Swim bouts are located on the basis of the curvature's trace. For each swim bout k we define the radius ρ_k where the bout started and the inter-bout delay / distance, respectively $\tau_k = t_{k+1} - t_k$ and $\delta_k = \rho_{k+1} - \rho_k$. (F) Traces of $\rho(t)$, $\alpha(t)$ and $\kappa(t)$ for a sample trajectory of a larva with both the visual system and the lateral line. A counterflow swim sequence of 31 bouts starts at $t \approx 3$ s (arrow).

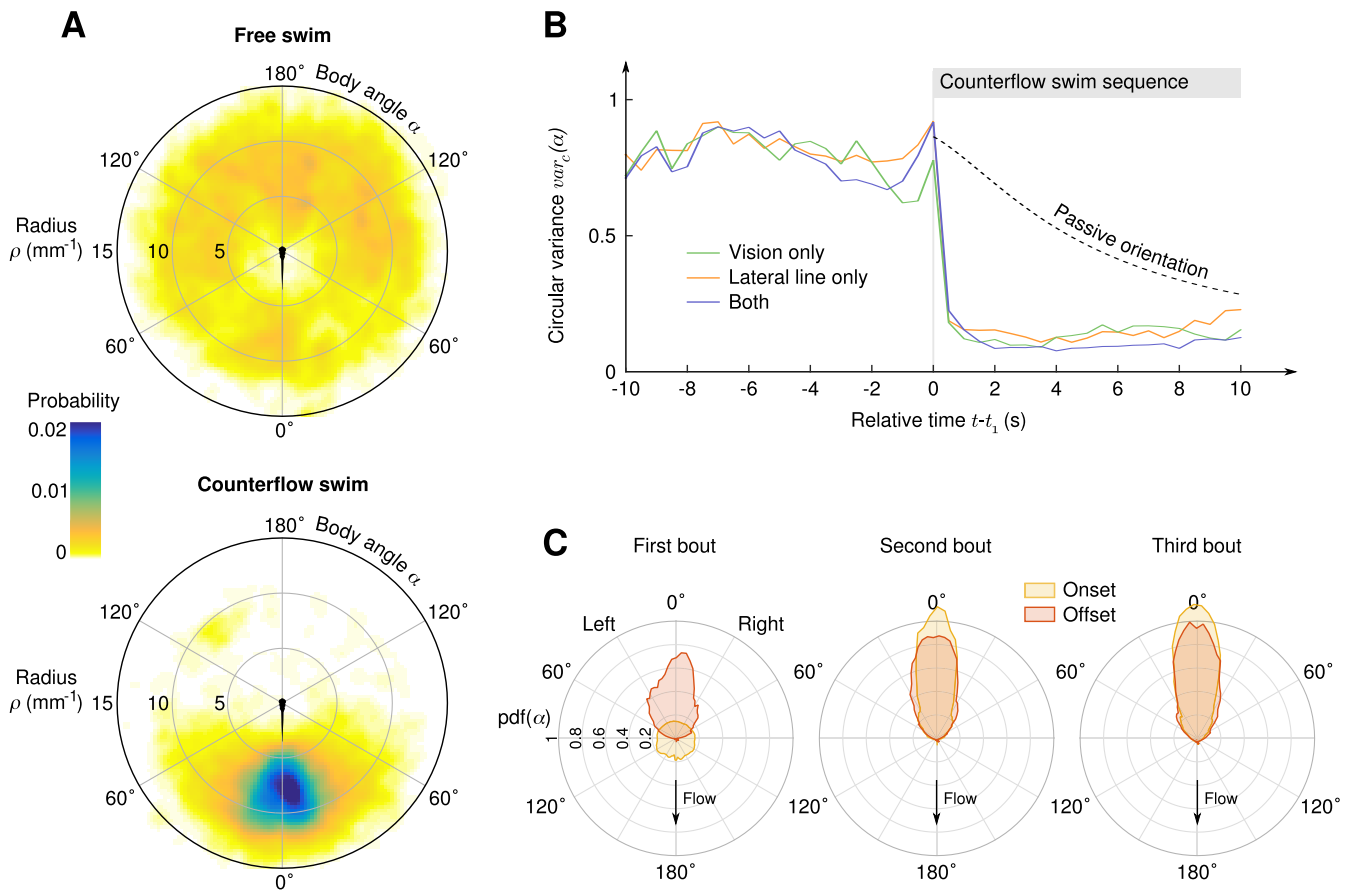


Figure 2. Transition from free-swim to counterflow swim (A) Probability density of the suction point's location in the reference frame of the larva, before (*top*) and during (*bottom*) the counterflow swim sequence. (B) Circular variance of α as a function of the time relative to the first bout of the CSS, for three different sensory conditions. The “passive orientation” curve has been obtained numerically by computing the circular variance of putative trajectories of inert larvae with the same initial conditions (position and body angle). (C) Distributions of the body angle α at the onset (yellow) and offset (red) of the first three bouts of the CSS.

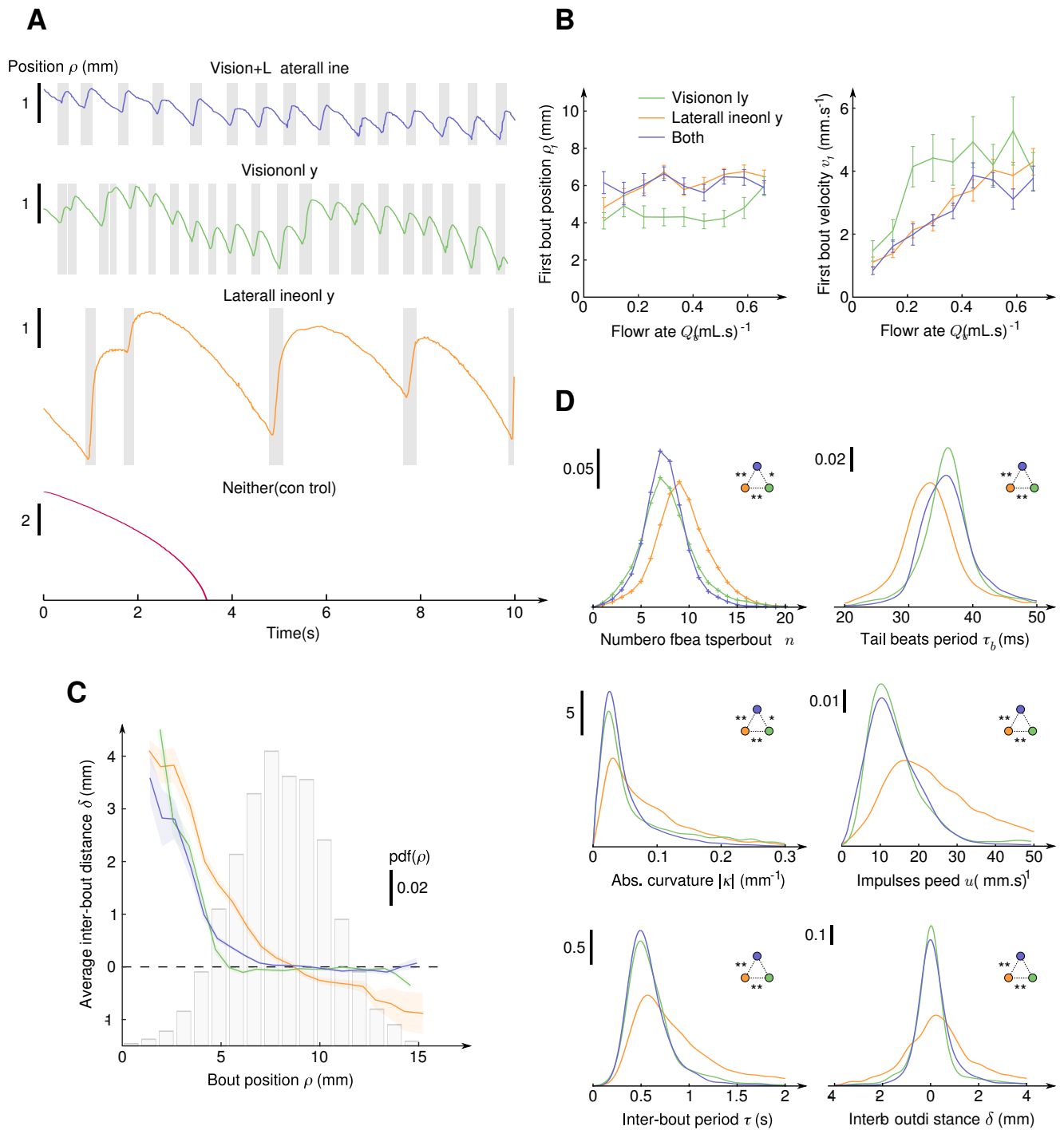


Figure 3. Initiation, characterization and regulation of counterflow swim sequences (A) Examples of radial traces $\rho(t)$ in the four sensory conditions. For the top three conditions the trajectories are representative of typical counterflow swim sequences. When both the lateral line and the visual system are disabled, no CSS appear and the larva is inexorably sucked. **(B)** Average radial position ρ_1 (left) and fluid velocity v_1 (right) at the onset of the first bout of the CSS as a function of the suction flow rate, for the three sensory conditions where CSS is observed. Error bars: standard error. **(C)** Average inter-bout distance δ as a function of the bout radial position ρ during the CSS. The dashed line at $\delta = 0$ indicates perfect distance holding. The bar plot shows the probability density function of ρ for all sensory conditions. The colored transparent surfaces indicate standard errors. **(D)** Probability density functions of six quantities characterizing the intra- and inter-bout behavior during the CSS for the three sensory conditions. Pdf were obtained with kernel density estimation with Gaussian kernels: $\sigma_k^n = 0.75$, $\sigma_k^{\tau_b} = 1$, $\sigma_k^{|\kappa|} = 0.01$, $\sigma_k^u = 2$, $\sigma_k^\tau = 0.075$ and $\sigma_k^\delta = 0.25$. Two-sample Kolmogorov-Smirnov tests were used to determine if distributions are significantly different from each other (* for $p < 10^{-3}$ and ** for $p < 10^{-6}$).

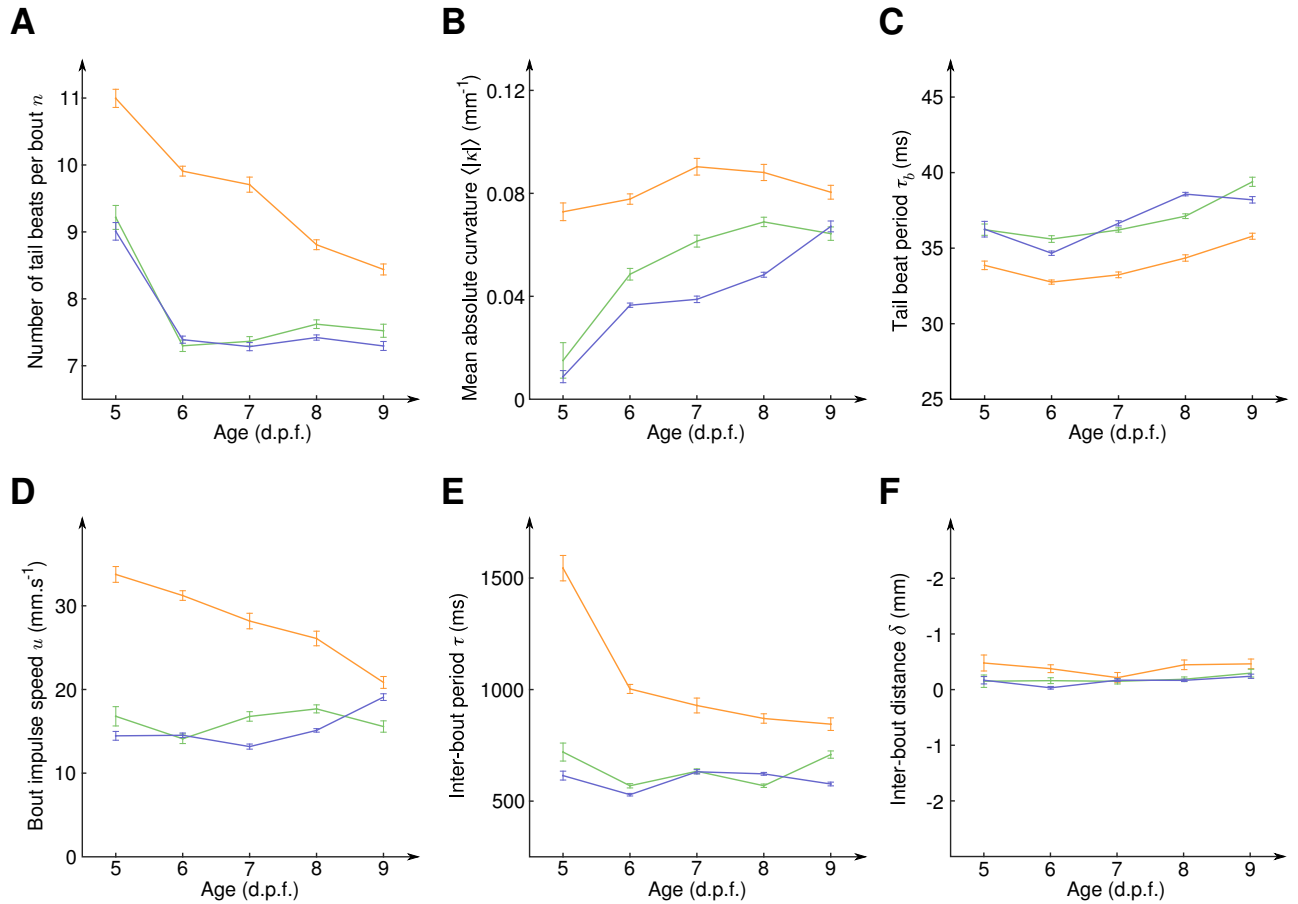


Figure 4. Evolution of the counterflow swimming patterns with age for the different sensory conditions. (A-D) Evolution of four intra-bout and inter-bout quantities as a function of age for three different sensory conditions: average number of tail beats per bout (A), mean absolute curvature (B), average bout impulse speed (C) and average inter-bout period (D). Error bars: standard errors.

2.4 Stimulations sous nappe laser

A l’instar de nombreuses autres études, l’article présenté dans la partie précédente décrit le rôle de la ligne latérale d’un point de vue comportemental. Dans cette partie seront présentés les différents dispositifs que nous avons testés pour mesurer, à l’aide du système d’observation par nappe laser décrit en détail dans la partie 3.2.1, les réponses neuronales évoquées lorsque les organes de la ligne latérale sont soumis à un écoulement, en attendant d’être étudiées sous le microscope à nappe laser bi-photonique afin de croiser cette modalité avec des réponses à des stimulations visuelles. Malheureusement, ces travaux expérimentaux n’ont pas abouti pour des raisons que nous ignorons encore, malgré plus de 9 mois de développement et d’ajustements. Néanmoins, la description des dispositifs développés pourra certainement être utile pour quiconque se penche sur l’épineux problème de la stimulation des neuromastes chez la larve de poisson-zèbre. C’est ce qui a motivé l’écriture de cette partie, qui, bien que succincte, rend compte au mieux des différentes tentatives.

2.4.1 Microfabrication et dispositif de stimulation

Au départ, l’objectif de cette thèse était de développer un dispositif de stimulation capable d’adresser les neuromastes individuellement (voir Fig.2.2, c & d). Ces systèmes peuvent être réalisés par micro-fabrication, domaine dans lequel les membres du Laboratoire Jean Perrin ont une solide expérience, en témoigne la récente publication de R.Candelier *et al.* sur les réponses comportementales et neuronales de larves de poisson-zèbre à une stimulation gustative [65], à l’aide d’un système microfluidique développé et conçu au laboratoire (voir Fig.2.2, a & b). Cependant, avant de nous lancer dans la fabrication de systèmes compliqués à fabriquer et à contrôler, nous souhaitions d’abord observer les réponses neuronales des larves lorsqu’elles étaient soumises à une aspiration semblable à celles subies en nage libre dans l’expérience de comportement, c’est-à-dire issues d’un unique point de succion situé à environ 1 cm de la queue des larves.

2.4.2 Nécessité de libérer la queue des larves

Premières tentatives infructueuses Le premier écueil rencontré dans le développement de notre système de stimulation a été de conserver l’intégrité des neuromastes de la ligne latérale postérieure, tout en maintenant la partie rostrale des larves dans l’agar. Nos premiers essais s’appuyaient sur le système existant auparavant pour maintenir la larve : cette dernière est plongée dans de l’agar encore liquide, puis aspirée à l’aide d’un capillaire.

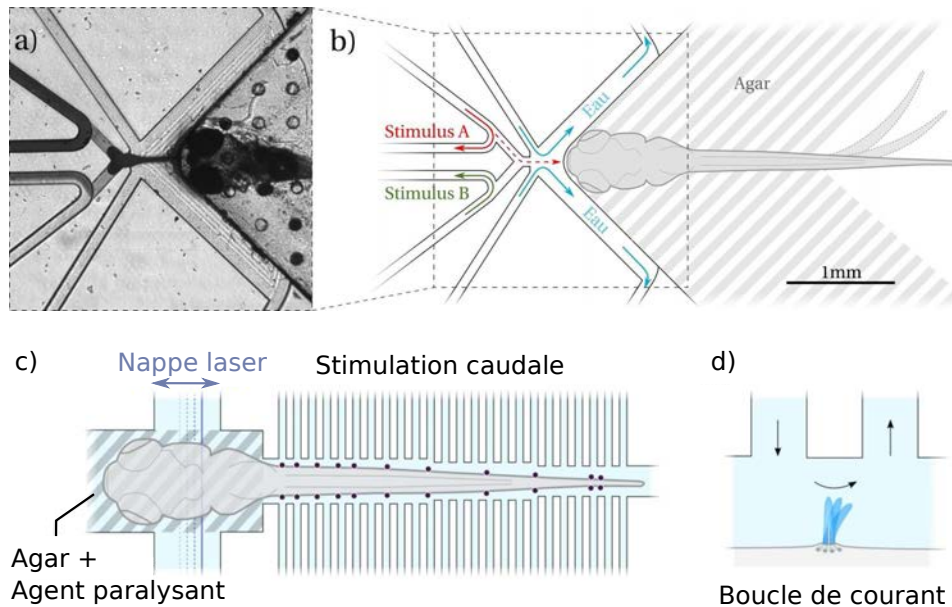


FIGURE 2.2: a) et b) Photo et schéma du montage expérimental réalisé au LJP permettant une stimulation gustative des larves de poisson-zèbre tout en observant leurs réponses comportementales via les mouvements de la queue [65]. c) Schéma du dispositif imaginé pour une stimulation individuelle des neuromastes, simultanément à une observation à l'aide de la nappe laser. La matrice de canaux microfluidiques, contrôlés par des micro-valves, doivent créer des boucles de courant au niveau des neuromastes de la ligne latérale postérieure (d).

L'agar gélifie alors, et il suffit de sortir la larve, contenue dans un cylindre d'agar, à l'aide d'un piston, pour disposer la larve dans la nappe laser. En effet, l'agar a un indice optique très proche de l'eau et ne modifie donc pas le trajet des rayons lumineux le traversant. La première tentative a donc simplement consisté à retirer à l'aide d'outils de micro-chirurgie, sans toucher la larve, l'agar au niveau de la queue et de laisser se détacher la partie du cylindre prédécoupée (voir Figure 2.3 A1, A2 & A3). Mais la coloration des neuromastes au DASPEI a permis de révéler que les neuromastes étaient endommagés par cette technique : lorsque l'agar est retiré, il arrache les neuromastes. Il a donc fallu songer à un moyen de maintenir la larve par la tête seulement, sans que la ligne latérale postérieure n'ait jamais été en contact avec l'agar. S'en sont suivies de nombreuses conceptions de dispositifs fabriqués par microfraisage qui permettraient de laisser la queue de la larve libre tout en coulant de l'agar autour de sa tête. La figure 2.3 (B1, B2 & B3) présente un de ces dispositifs les plus aboutis. Il est composé de deux pièces P1 et P2, P1 étant creusée avec une rigole (R) où placer la larve et P2 composée d'un plafond avec des piliers rectangulaires de différentes hau-

teurs. Les piliers de P2 viennent délimiter une zone où l'agar est censé être confiné, tout en permettant l'évacuation de l'air par les côtés. Mais cette approche n'a pas fonctionné non plus, car il nous a été impossible d'établir une étanchéité parfaite entre les zones supposées *avec* et *sans* agar.

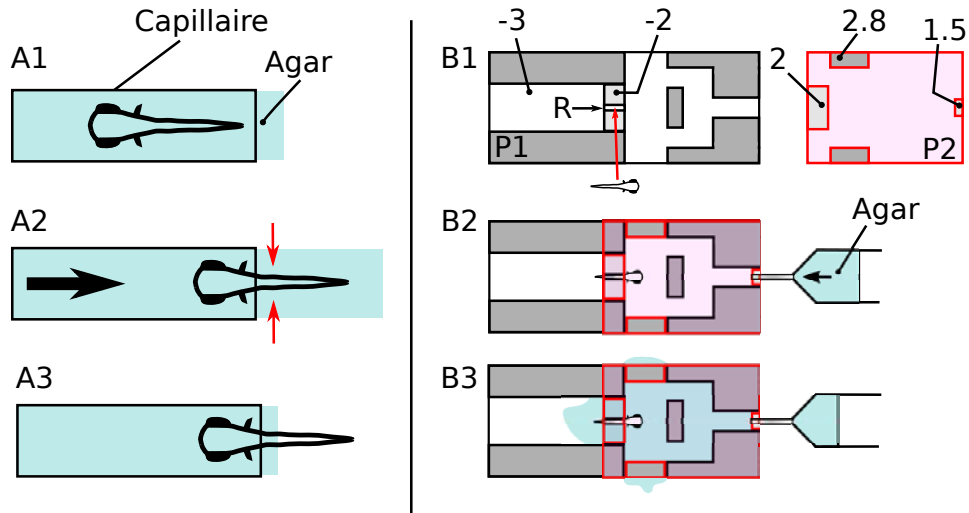


FIGURE 2.3: Illustration des différentes techniques tentées pour laisser libre la queue des larves de poisson-zèbre pour la stimulation de leur ligne latérale postérieure. A) Découpe de l'agar autour de la queue. A1 : La larve est à l'intérieur d'un capillaire, dans de l'agar gélifié (A1). On peut alors la sortir à l'aide d'un piston non représenté ici et couper l'agar autour de sa queue (A2). Ainsi, la queue est libre (A3) et la tête toujours dans l'agar, prête pour l'observation, mais les neuromastes sont détruits lorsque l'agar est retiré. B) Exemple de dispositif alternatif. Cette fois il n'y a plus de capillaire, et le dispositif est prêt à être introduit tel quel sous la nappe laser. (B1) La larve est d'abord placée sur la rigole (R). Puis la pièce P2 est placée sur la pièce P1 (B2), en fermant quasi-hermétiquement l'accès à la queue de l'animal au-dessus de la rigole R. Les accès latéraux servent à la fois de fenêtre d'observation pour la nappe laser et de chemin d'évacuation pour l'air chassé par l'agar (la pièce P2 ne ferme pas complètement ces issues avec les piliers de 2.8 mm). L'accès en face de la larve n'est pas totalement fermé (environ 1.5 mm d'espace vertical) pour permettre l'introduction d'une seringue et l'injection de l'agar encore liquide, qui ne reste malheureusement pas confiné dans la première partie du dispositif et envahit la région contenant la queue de la larve (B3).

Dispositif retenu Devant les échecs rencontrés avec les dispositifs du type de ceux décrits ci-dessus, nous avons fini par nous tourner vers une technique conservant l'utilisation du capillaire, en particulier parce qu'elle permet une rotation de la larve sur son axe au moment où celle-ci est introduite dans le microscope. Après de nombreuses tentatives et ajustements pour obtenir les bonnes dimensions, nous sommes parvenus à concevoir un dispositif permettant de bloquer la tête de la larve dans l'agar sans mettre sa queue en contact avec le gel. Le protocole retenu est décrit ici, et fait référence aux éléments de la figure 2.4.

L'idée de ce petit dispositif, entièrement réalisé à partir de deux pièces de PMMA usinées à la microfraise, est d'utiliser les lignes de courant dans l'écoulement de Poiseuille à l'intérieur du capillaire contenant la larve. La première pièce, en plus des deux embouts permettant de connecter le capillaire d'un côté et une seringue Terumo de 60 mL de l'autre (Fig.2.4 - A1 & A2), présente un trou central de 350 μm de diamètre prévu pour accueillir la queue de la larve (Fig. 2.4 A3), qui s'y logera naturellement lors de son aspiration (Fig.2.4 - B1). De l'agar concentré à 2% encore liquide, dont la température est maintenue au-dessus de 37 degrés à l'aide d'une réserve d'eau chaude, est alors aspiré une fois la larve bloquée (Fig.2.4 - B2) dans le trou de 350 μm . Cet agar recouvre la tête de la larve, mais celle-ci joue le rôle de bouchon et force l'écoulement à passer par les trous périphériques de 180 μm (Fig.2.4 - B3). Une fois l'agar gélifié, et la face F2 de la pièce P1 nettoyée de l'agar, une goutte d'embryomedium (EM) est déposée en sortie de P1 afin de pouvoir rentrer un peu la larve dans le capillaire tout en remplissant le capillaire de liquide et d'éviter les bulles d'air. La pièce P2, identique à P1 à la différence des micro-canaux remplacés par un canal dont le diamètre permet le passage du capillaire, est alors connectée à l'autre bout du capillaire, et la larve aspirée dans l'autre sens. De la sorte, le capillaire est prêt à être introduit dans le dispositif d'observation.

Des tests ont été réalisés en colorant l'agar à l'aide de rhodamine afin de visualiser les piliers formés dans les canaux de 180 μm et de vérifier quela larve n'était pas en contact avec l'agar. Les résultats ont été positifs, de même que le test au DASPEI qui nous a permis de nous assurer de l'intégrité des neuromastes après l'opération.

Stimulations hydrodynamiques sous nappe laser

Les stimulations produites afin d'exciter les organes mécanorécepteurs des larves de poisson-zèbre positionnées sous la nappe laser grâce au système décrit ci-dessus provenaient du même point de succion que celui utilisé pour l'expérience comportementale (une pointe de seringue pliée, voir partie *Ma-*

terials and Methods de l'article, mais les sources de pression ont varié selon les stimulations que nous avons tentées.

Voici les différentes types de stimulations que nous avons essayées, successivement :

- Avec la pompe péristaltique déjà utilisée en comportement : à l'aide de ballastes pour homogénéiser l'aspiration. Les débits testés vont, en aspiration, de 10% à 50% du débit maximal et jusqu'à 20% en refoulement (les deux directions de courant ont été testées)
- Avec la pompe péristaltique toujours, des rampes ont été programmées, afin de simuler au mieux l'effet d'une aspiration en nage libre.
- Avec une pompe classique (VWR Vacuum Gas Pump) et un régulateur de pression, pour limiter encore les saccades, et un système de micro-valves pour déclencher la stimulation à un instant précis.
- Enfin, toujours avec cette pompe et ce régulateur de pression, le temps de réponse très court des micro-valves a été utilisé pour produire des stimulations en fréquences à 10, 20 et 50 Hz, car ce sont ces fréquences qui seraient le plus à même de déclencher des réponses de la part des neuromastes d'après McHenry *et al.* [51].

Cependant, aucune de ces stimulations n'a permis d'observer de réponses neuronales, que ce soit dans le ganglion de la ligne latérale postérieure ou dans le rhombencéphale, où ces neurones primaires devraient projeter.

Enfin, nous avons essayé un autre protocole qui se base sur la régénération des neuromastes. Il est en effet connu [66] qu'après une ablation chimique sévère (destruction totale des cellules ciliées et des cellules du manteau) les neuromastes peuvent se reformer et redevenir fonctionnels sous 24h. Nous avons donc préparé des larves dans un cylindre d'agar basse concentration (1%) avec la queue libérée mécaniquement, que nous avons laissé reposer 24h.

Nous avons ensuite vérifié que les neuromastes étaient fonctionnels en traitant une partie des larves au DASPEI puis stimulé ces larves fixées avec un point de succion proche de l'extrémité de la queue avec des débits comparables, voire supérieurs à ceux présentés dans notre article. Nous n'avons alors observé ni mouvement d'échappement ni séquence de nage à contre-courant. Ce résultat négatif suggère que le simple fait que la larve soit fixée est probablement en soi un facteur suppressif de la rhéotaxie. Or, nous avons vu dans l'article que le système vestibulaire, responsable de la détection des accélérations, ne permet pas à lui seul de générer un comportement rhéotactique puisque le poisson a besoin d'au moins son système visuel ou de sa ligne latérale. On pourrait donc penser qu'il ne joue aucun rôle dans le déclenchement de la nage à contre-courant.

Afin de relier toutes ces observations entre elles, une hypothèse pos-

sible serait que le système vestibulaire joue un rôle très en amont dans la chaîne de traitement de l'information sensorielle. Pour donner une comparaison imagée, on pourrait lui attribuer un rôle similaire à celui qu'aurait un interrupteur placé juste après la source de puissance dans un circuit électrique : lorsqu'il est ouvert (poisson fixé), rien ne se passe dans le circuit alors que lorsqu'il est fermé (poisson libre) le reste du circuit impose ses caractéristiques. Du point de vue de l'expérimentateur qui essaye de comprendre le circuit en ayant juste accès à ses sorties, la présence de l'interrupteur est indétectable tant qu'il n'est pas actionné. Pour nos expériences de comportement, la vérification de cette hypothèse est difficile expérimentalement et a dépassé le cadre de cette thèse. Volker Bormuth, maître de conférence au Laboratoire Jean Perrin, monte actuellement un dispositif qui permettra de stimuler le système vestibulaire de larves de poisson zèbre tout en les soumettant à des stimulations visuelles et en réalisant de l'imagerie calcique de neurones en nappe laser. Ce type de dispositif permettra, en plus des nombreux projets qui lui sont associés, de tester cette hypothèse en toute rigueur.

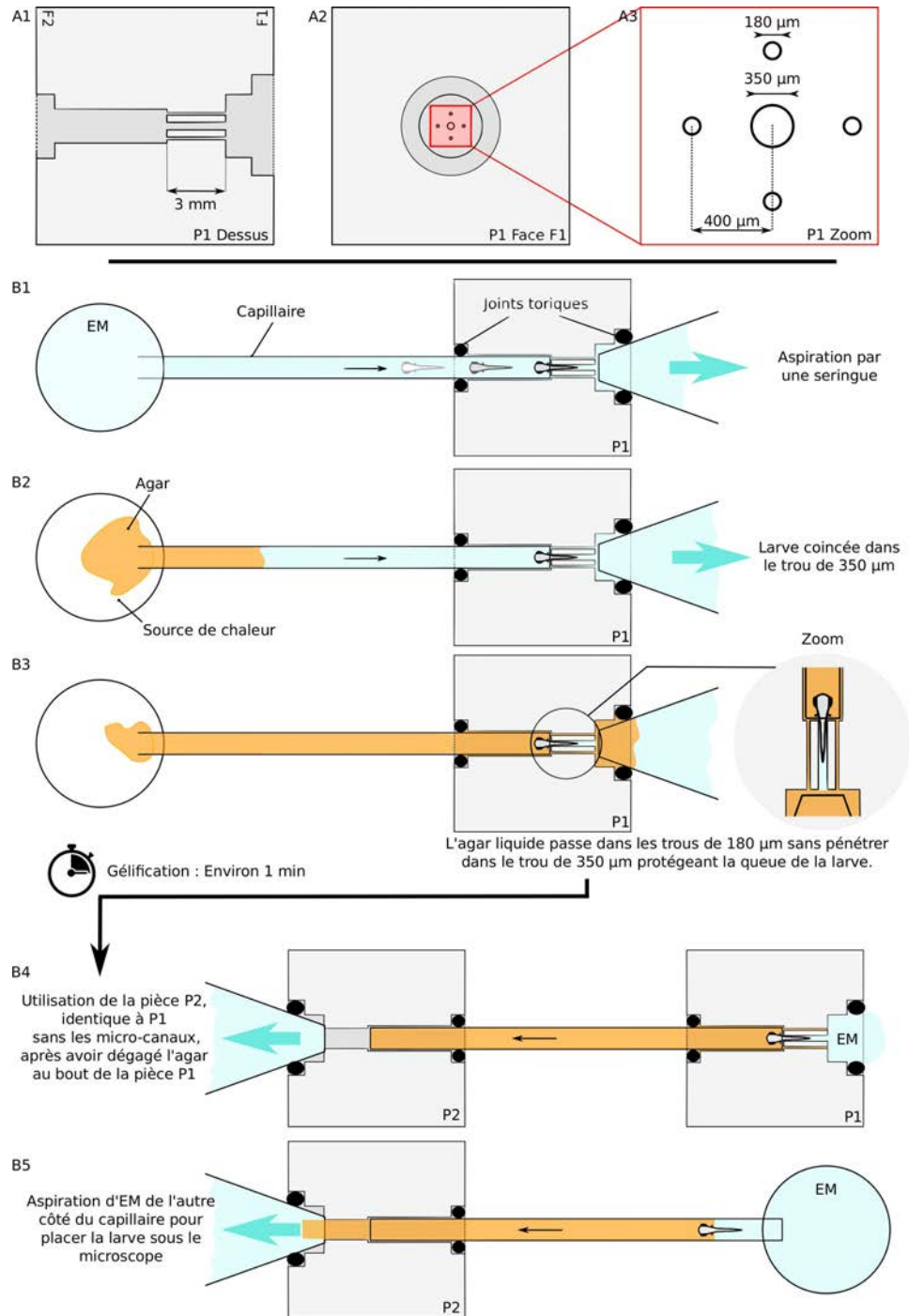


FIGURE 2.4

Chapitre 3

Détection d'ondes acoustiques

Contents

3.1	Introduction et état de l'art	47
3.2	Présentation du système	51
3.3	Présentation des méthodes d'analyse	60
3.4	Résultats expérimentaux	70

3.1 Introduction et état de l'art

La perception des écoulements à l'aide de la ligne latérale, présentée précédemment, est une modalité propre aux poissons et aux amphibiens leur permettant de se représenter leur environnement. D'autres systèmes sensoriels collectent également des informations afin de les renseigner sur ce qui les entoure : on a vu au chapitre précédent comment les mouvements de nage de larves de poisson-zèbre présentaient des motifs différents selon les modalités utilisables par les individus, entre système visuel et ligne latérale. Mais il existe un autre système sensoriel que peuvent utiliser les poissons pour évaluer leur environnement, qui à la fois dans son rôle et dans sa structure va de pair avec la ligne latérale.

En effet, les cellules ciliées constituant en partie les neuromastes des poissons peuvent également être rencontrées dans leur oreille interne [67] [68] (les poissons n'ont ni oreille externe - partie de l'oreille contenant le tympan et le pavillon qui capte l'onde sonore - ni oreille moyenne - chargée de la transmission de l'onde du tympan à l'oreille interne), à l'intérieur des trois organes otolithiques impliqués à la fois dans la détection des vibrations mécaniques et la perception des accélérations (système vestibulaire) que sont l'*utricule*, la *sacculle* et la *lagéna*, ainsi que dans les trois canaux semi-circulaires appar-

tenant également à l'oreille interne, qui permettent aux poissons de ressentir les accélérations, dans les trois directions de l'espace (voir Fig. ?? A et B). Les poissons n'ayant pas d'organe spécifiquement dédié à l'audition, comme la cochlée chez les mammifères, les organes otolithiques cités ci-dessus jouent un rôle dans le système vestibulaire et le système auditif.

3.1.1 Description et fonctionnement de l'oreille interne des poissons

Tous les organes de l'oreille interne comportent un épithélium de cellules ciliées [69] (voir Fig. ?? - B). A l'intérieur des canaux semi-circulaires, celles-ci sont également recouvertes d'une cupule, comme pour les neuromastes de la ligne latérale. En revanche, l'épithélium des trois organes otolithiques est couplé via une fine membrane gélatineuse (dans laquelle sont pris les kinocils des cellules ciliées) à un otolithe (structure calcique dense) ou à une matrice gélatineuse contenant des cristaux augmentant sa densité [70] [71] [72] (voir Fig. ?? - A). La détection des ondes acoustiques à l'aide de ces trois organes repose sur la différence de densité entre l'otolithe et le reste du corps du poisson. En effet, pour assurer leur flottabilité, les poissons ont une densité très proche de celle de l'eau, donc le passage d'une onde sonore entraîne un mouvement de l'ensemble du poisson avec l'eau. Les otolithes ayant une densité environ trois fois plus grande [69], leur mouvement dû au passage de l'onde acoustique sera retardé par rapport au reste du corps du poisson. C'est ce décalage qui stimule les cellules ciliées, et qui permet à l'oreille interne de détecter cette onde. Cela signifie également, bien que cela soit contre-intuitif pour un humain, que soumettre un poisson à une onde acoustique ou le faire vibrer mécaniquement sera ressenti identiquement par l'animal. Le dispositif mis au point tire partie de cette équivalence.

Par ailleurs, le problème de la localisation des sources sonores dans l'eau permet également de comprendre la structure de l'oreille interne. La célérité du son dans l'eau est d'environ 1500 m/s, et les fréquences audibles par les poissons sont en général inférieures à 1 kHz [73]. Ainsi, la longueur d'onde typique perçue par les poissons est de l'ordre de :

$$\lambda = \frac{c}{f} \approx \frac{1500}{1000} \approx 1.5m \gg \text{largeur du poisson.}$$

A titre de comparaison, pour un son de la même fréquence émis dans l'air où la vitesse du son est environ 5 fois plus faible, la longueur d'onde sera d'environ $\lambda = 30cm$. Cette longueur est du même ordre que la distance entre les deux oreilles d'un humain, et permet d'utiliser la *différence de temps interaurale*, c'est-à-dire le déphasage entre l'arrivée de l'onde sonore entre les deux oreilles, pour localiser un son dans le plan horizontal (Pour la localisation verticale du son, une analyse fréquentielle des distorsions du son dues

aux réflexions dans le pavillon et sur d'autres parties du corps permettent au système auditif de déduire l'angle d'incidence de l'onde sonore).

On comprend donc que pour un poisson d'une largeur de quelques millimètres à quelques centimètres, ce déphasage interaural ne saurait être utilisé pour déterminer l'origine spatiale d'une onde acoustique [74]. L'oreille interne comprend trois organes otolithiques, chacun comportant de nombreuses cellules ciliées orientées dans des directions différentes. Ces orientations variées au sein de chaque organe permettent *in fine* aux poissons de percevoir l'onde acoustique incidente (voir Fig. ?? - C à E) quelle que soit sa direction de propagation. En pratique, chez la larve de poisson-zèbre, c'est essentiellement le saccule qui détecte les sons, grâce à un otolithe sensiblement plus gros que chez les autres organes otolithiques, tandis que l'utricule sert à détecter les rotations de l'animal [75].

Les ondes sonores, dans un fluide, peuvent être décrites par la propagation de deux quantités : une variation locale de pression, et un déplacement des particules du fluide, décrit par la *vitesse particulaire*. Cette vitesse particulaire est différente de la vitesse de l'onde, cette dernière caractérisant le transport de l'énergie. Pour les poissons dépourvus de vessie natatoire (une poche de gaz à l'intérieur de l'organisme [76]), seule une des deux composantes de l'onde sonore, à savoir le déplacement de particules qui accompagne sa propagation (et décrit par la vitesse particulaire définie ci-dessus), participe à la perception de l'onde. Mais chez les poissons possédant cette vessie natatoire (souvent présentés comme des *spécialistes de l'audition*), la composante de l'onde sonore faisant intervenir la variation de pression est pressentie comme pouvant également jouer un rôle en complément du premier système, car le volume de la vessie natatoire varie lors du passage de l'onde acoustique [77] [78]. Il a par exemple été démontré par Canfield *et al.* que via un réseau d'osselets de Weber, la vessie natatoire pouvait, lors de ses changements de volume causés par l'onde de pression, abaisser les seuils de détection des vibrations. Les osselets transmettent ces changements de volume jusqu'à l'oreille pour induire des réponses neuronales dans les cellules de Mauthner, responsables de mouvements réflexes d'échappement chez de nombreuses espèces [79]. Il est intéressant de noter que dans ce processus, la direction de l'onde incidente est détectée par la composante particulaire de l'onde acoustique : selon la provenance de l'onde, l'oreille interne inhibe l'une ou l'autre des cellules de Mauthner afin de déclencher un mouvement de fuite dans la bonne direction. Néanmoins, c'est bien la détection de la composante de pression, via la vessie natatoire et les osselets de Weber, qui provoque ce brusque mouvement réflexe.

3.1.2 Réseaux neuronaux de la voie auditive

Les cellules ciliées de l'épithélium des organes otolithiques projettent d'abord via le 8ème nerf ou nerf octavolatéral [80], qui contient les fibres nerveuses des cellules ciliées de l'oreille interne ainsi que de la ligne latérale, dans le rhombencéphale, en partie dans le cervelet, où se situe le lobe vestibulo-latéral comprenant l'*eminentia granularis*, et en partie dans la *medulla oblongata* ou myélocéphale, où se trouvent les cellules de Mauthner, citées ci-dessus [81], ainsi que les noyaux *magnocellular octaval nucleus* et *descending octaval nucleus*. De ces noyaux partent des projections dans le mésencéphale, et plus particulièrement dans le *torus semicircularis* [82], dans le *central nucleus torus semicircularis*. De cette région mésencéphalique enfin, on a observé des projections dans plusieurs régions du télencéphale [83] : tout d'abord dans le *thalamus* [61] et le *preglomerular complex*, qui sont des zones relais de l'information sensorielle, ainsi que dans le *pallium*, forme primitive du cortex cérébral.

Ces projections, à différents niveaux, sont proches de celles de la ligne latérale, mais d'après la littérature, il y aurait peu de recouvrement entre les projections des neuromastes et celles de l'oreille interne. L'analyse des interactions intermodales entre ces deux organes, par exemple pour toutes les tâches dédiées à la localisation d'une source, représente un des enjeux de l'étude des circuits neuronaux impliqués dans chacune de ces deux modalités sensorielles [84].

3.1.3 L'audition chez la larve de poisson-zèbre

La plupart des ouvrages et publications cités précédemment sont consacrés à l'étude de l'oreille interne de poissons adultes, souvent chez le poisson rouge, *Carassius auratus*. La littérature présente peu de résultats sur le fonctionnement de l'oreille interne du poisson-zèbre (*Danio rerio*) à l'état larvaire, l'adulte ayant fait l'objet de plusieurs études sur le système auditif, que ce soit sur la détection de défauts dans l'oreille interne [85], l'apprentissage [86], ou les organes otolithiques en eux-mêmes [87].

La majorité des études menées à ce jour sur l'oreille interne de la larve de poisson-zèbre portent sur le développement de cet organe [88] [89] : plusieurs articles décrivent les différentes étapes de la formation des organes otolithiques, des cellules ciliées [54] aux otolithes [90], en passant par le rôle des osselets de Weber au cours du développement [91]. Mais peu d'articles font état d'enregistrements de signaux neuronaux en réponse à des stimulations auditives, en dehors d'une étude d'Eaton et Kimmel sur les cellules de Mauthner [81] et d'une récente étude de Bhandiwad *et al.* sur l'effet d'inh-

bition d'une faible vibration avant une stimulation [92].

Chez la larve de poisson-zèbre, les organes de l'oreille interne commencent à se développer dès 24h après fertilisation [89] [93] mais ne deviennent efficaces qu'à partir de 5 jours après fertilisation, du moins en ce qui concerne les trois organes récepteurs d'ondes acoustiques et leur capacité à déclencher une réponse réflexe, d'après Zeddies *et al.* [94]. Toujours d'après cette étude, il apparaît que les seuils de réponse du poisson-zèbre à une stimulation acoustique restent inchangés jusqu'au développement des osselets de Weber, et que ces seuils sont indépendants de l'état de la vessie natatoire. En revanche, chez l'adulte, l'intégrité de cet organe et son couplage avec les osselets de Weber, qui se développent tardivement (selon Higgs *et al.*, ces osselets sont bien formés lorsque les poissons atteignent une taille de 19,5 mm [91]), baissent sensiblement les seuils de détection de l'oreille interne.

Notre étude des réponses neuronales s'inscrit donc dans une dynamique nouvelle d'investigation des mécanismes, à l'échelle du système nerveux dans son ensemble, de détection et d'analyse des stimulations auditives. A partir des résultats présentés ci-dessus, nous avons pu concevoir nos expériences : nous avons alors une idée de la gamme de fréquence et des seuils audibles par les larves de poisson-zèbre, ainsi que de l'âge que devaient avoir les larves avec lesquelles nos expériences seraient réalisées. A partir des travaux déjà effectués sur d'autres espèces de poissons, nous avons aussi quelques indications sur les zones cérébrales dans lesquelles l'activité serait *a priori* évoquée par des stimulations acoustiques.

3.2 Présentation du système

3.2.1 Système d'observation

Le système d'imagerie utilisé est le microscope à nappe laser développé par Thomas Panier durant son doctorat au Laboratoire Jean Perrin [30]. Cependant, des modifications lui ont été apportées, qui ont transformé cet instrument d'optique en plate-forme synchronisant stimulations et acquisition d'images.

Le dispositif, qui comportait un miroir vibrant horizontalement à 400 Hz couplé à un système de lentilles afocal et un objectif de microscope utilisé comme objectif d'illumination, permettait de créer à partir d'un faisceau laser (488 nm) une nappe laser. L'échantillon, une larve de poisson-zèbre paralysée et maintenue dans un gel d'agar, se trouvait alors illuminé par la nappe, et un objectif d'observation à immersion couplé à une lentille de tube récupérait le signal de fluorescence, l'acquisition étant assurée par une

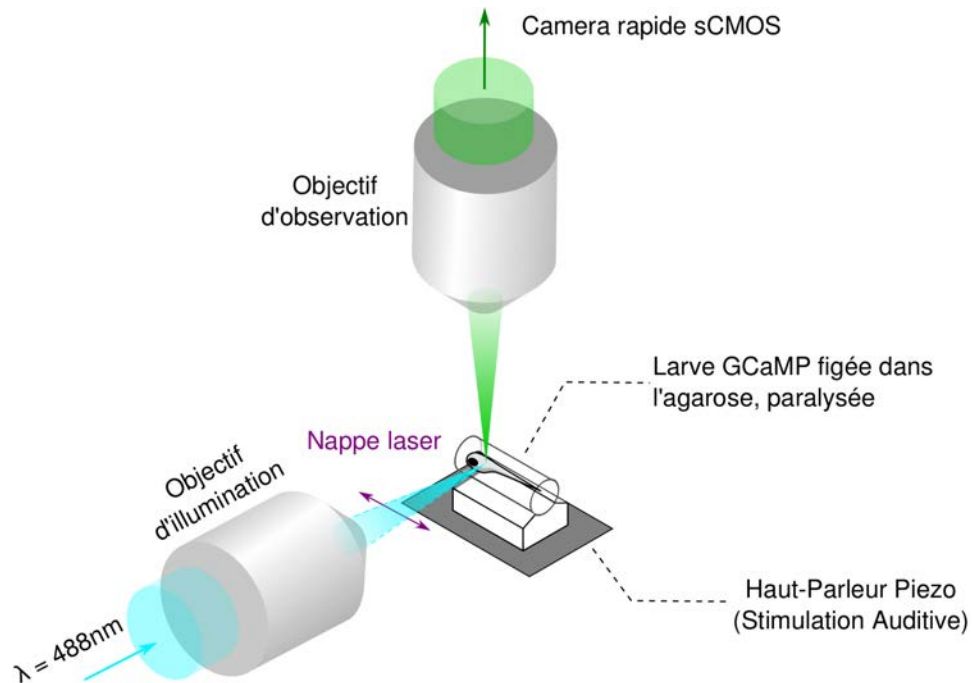


FIGURE 3.1: Schéma : vue 3D du dispositif d'observation en aval de la nappe laser.

caméra sCMOS en sortie de la lentille de tube.

L'altitude de l'échantillon pouvait être contrôlée à l'aide d'un positionneur piezo-électrique placé sous la cuve contenant l'échantillon. Ainsi on pouvait choisir la couche de l'échantillon que l'on souhaitait imager, simplement en déplaçant la cuve portant l'échantillon, les positions respectives de la nappe laser et de l'objectif d'observation restant fixes. Ce déplacement est surtout utile pour les observations multicouches, permettant une visualisation en trois dimensions de l'échantillon.

Introduction d'un miroir vertical

La principale modification apportée au dispositif, en-dehors d'ajustements logiciels, a été l'ajout d'un nouveau système afocal et d'un second miroir en amont du miroir vibrant. Ce second miroir, identique au premier, permet de régler l'altitude de la nappe. Il est commandé par le programme LabVIEW (National Instruments) décrit précédemment, et son orientation est corrélée à l'altitude du support piezo-électrique sur lequel l'objectif d'observation est fixé, afin que ce dernier soit toujours à distance focale de la nappe laser, et donc du plan de l'échantillon illuminé.

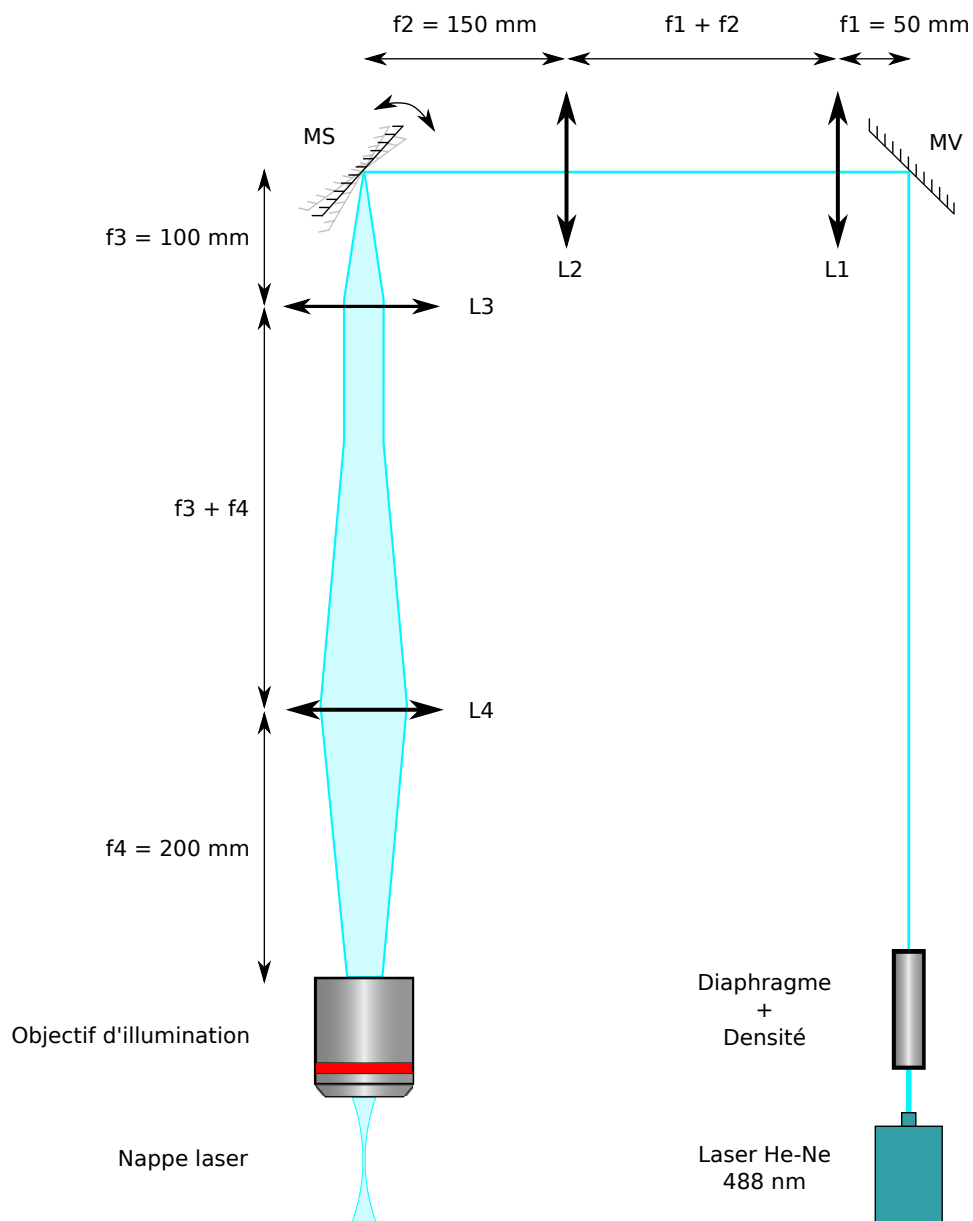


FIGURE 3.2: Dispositif d'observation : Illumination de l'échantillon. Les couples de lentilles $\{L1 + L2\}$ et $\{L3 + L4\}$ forment deux systèmes afocaux.

Pour intégrer correctement ce miroir (MV sur la figure 3.2) au système d'illumination, un système afocal de grossissement 3 a été ajouté entre les deux miroirs, et le grossissement du système afocal situé en aval du miroir de scan (MS sur la figure 3.2) a été réduit à 2. Ainsi, le grossissement global

du système reste égal à 6, comme pour le dispositif sans miroir vertical.

De la sorte, la cuve contenant la larve est désormais immobile, et c'est la nappe laser qui voit son altitude varier. Les stimulations auxquelles sera soumise la larve étant acoustiques, et les zones de l'oreille interne et de l'oreille externe étant proches du point de vue morphologique et fonctionnel, il est en effet préférable que la larve ne subisse pas d'accélération brusques lors du changement de couche d'observation.

La majorité des expériences présentées dans ce chapitre tirent parti de cette amélioration : 10 couches espacées de $8\mu\text{m}$ sont imagées à une fréquence de 2 Hz par couche, sans que la larve ne soit déplacée. La contrepartie de cette méthode est l'apparition d'une sorte de vibration mécanique lorsque l'objectif d'observation passe de la couche la plus profonde à la couche la moins profonde. Ceci occasionne un flou sur l'image prise juste après le déplacement, c'est à dire sur la couche la plus dorsale (voir Fig. 3.3). La couche en question est la plupart du temps sacrifiée et n'est donc pas analysée (cf. figure 3.3).

3.2.2 Système de stimulation

Après quelques tests préliminaires réalisés avec Andrea Zecca, doctorant dans l'équipe de Cristina Pujades, en août 2014, le dispositif traditionnellement la larve, à savoir un capillaire contenant de l'agar et un piston pour extraire, a été abandonné au profit d'une plate-forme de PMMA usinée à la micro-fraise, sur laquelle la larve est déposée (voir figure 3.4). En effet, d'après ce que l'on sait sur le fonctionnement de leur oreille interne (cf. introduction du chapitre), c'est uniquement le décalage entre le mouvement de l'otolithe et le reste du corps des poissons qui déclenche des réponses à une stimulation acoustique. Ainsi, afin de s'affranchir de résonances parasites dues au capillaire ou à d'éventuelles réflexions de l'onde émise par le haut-parleur au sein de la cuve, nous avons choisi de simplement poser la larve de poisson-zèbre sur le haut parleur, au moyen d'une plate-forme décrite ci-après. Cette plate-forme est collée sur le haut-parleur, et le tout est amené sous le microscope à nappe laser à l'aide d'un micromanipulateur.

Plate-forme portant l'échantillon

La plate-forme (voir Fig. 3.4) est prévue pour accueillir une larve dans un cylindre tubulaire d'agar, similaire à celui utilisé avec le système de capillaire et de piston. En effet, la géométrie cylindrique permet de positionner la larve dos à l'objectif d'illumination afin d'obtenir des images les plus

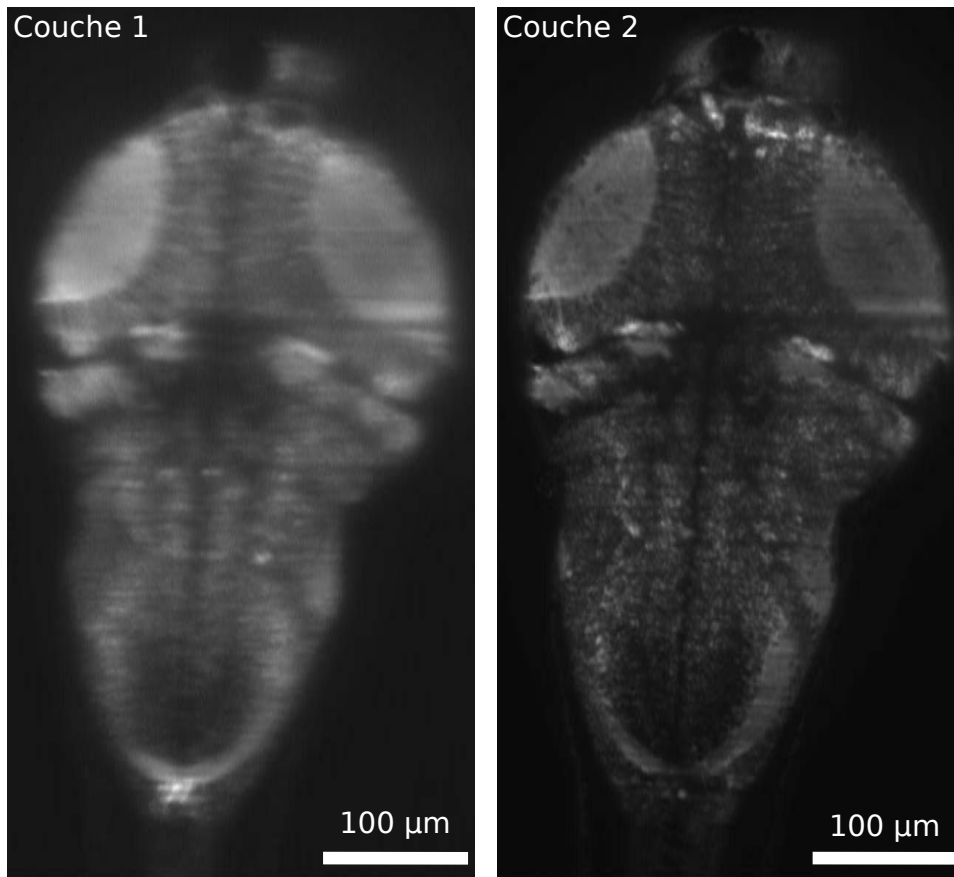


FIGURE 3.3: Comparaison entre des images, moyennées sur plusieurs cycles de stimulation, des couches 1 (à gauche) et 2 (à droite).

Ces images sont prises juste après une stimulation, et on peut voir l'impact de la vibration du haut-parleur, en plus du mouvement de l'objectif d'observation, sur la qualité de l'image de la couche 1.

En revanche, les images de la couche 2 (et des suivantes) sont parfaitement exploitables, y compris juste après une forte vibration.

symétriques possibles, tout en évitant à la lumière émise par la fluorescence d'être diffractée par la traversée des viscères de l'animal (ce qui arrive si la larve présente son ventre à l'objectif d'observation). La larve est donc d'abord introduite dans un capillaire avec de l'agar, puis, une fois ce dernier gélifié, sortie et déposée sur la rigole usinée sur la plate-forme, présentant sa partie dorsale à l'objectif d'observation.

Plusieurs types de rigoles ont été testées, et le choix d'une rigole de diamètre 1 mm pour une hauteur d'environ $0,30\text{ mm}$ est apparu comme le meilleur compromis entre un bon maintien du cylindre contenant la larve et une profondeur pas trop importante pour que la larve ne se trouve pas à hauteur du PMMA une fois l'agar inséré dans la rigole (cf. Figure 3.4).

Pour s'assurer que le cylindre d'agar ne soit pas décollé du porte-échantillon lorsque le haut-parleur vibre, une goutte d'agar chaud est déposée sur le cylindre une fois celui-ci en place. En solidifiant après avoir colmaté la rigole, cet agar supplémentaire crée un lien entre le cylindre et le PMMA.

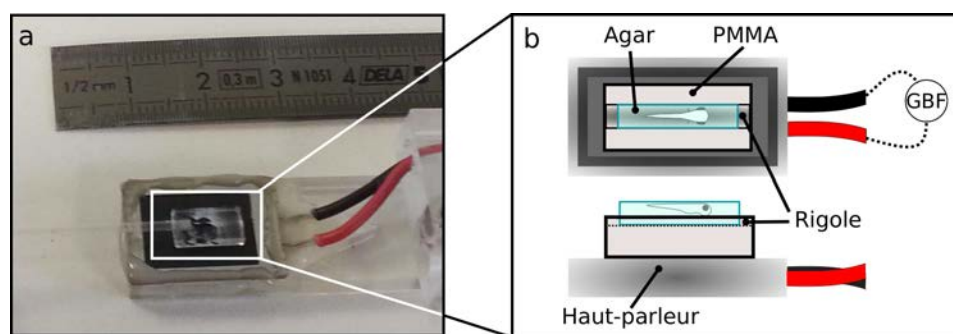


FIGURE 3.4: Plate-forme portant le haut-parleur :

a) Toutes les parties métalliques sont isolées de l'eau grâce à une couche d'Araldite, y compris les soudures des fils. La pièce en plexiglas comporte des pas de vis permettant de la fixer au micromanipulateur

b) Schéma du porte-échantillon : une rigole d'un diamètre d' 1 mm , identique à celui du cylindre d'Agar, sur une profondeur de $0,3\text{ mm}$ a été pratiquée pour déposer le cylindre d'Agar contenant la larve.

Génération de signaux acoustiques

Les stimulations acoustiques sont générées par un haut parleur piézo-électrique (Waterproof Piezoelectric Speaker, VSLBG Series, muRata Manufacturing co.) commandé par un Générateur Basses Fréquences (HP 33120A 15 MHz Arbitrary Waveform Generator, Hewlett Packard), qui envoie des signaux sinusoïdaux d'une durée de 10 ms et d'une fréquence constante de 750 Hz au haut-parleur placé sous la larve. L'amplitude du déplacement du haut-parleur est proportionnelle à la tension imposée à ses bornes (cf. 3.5)

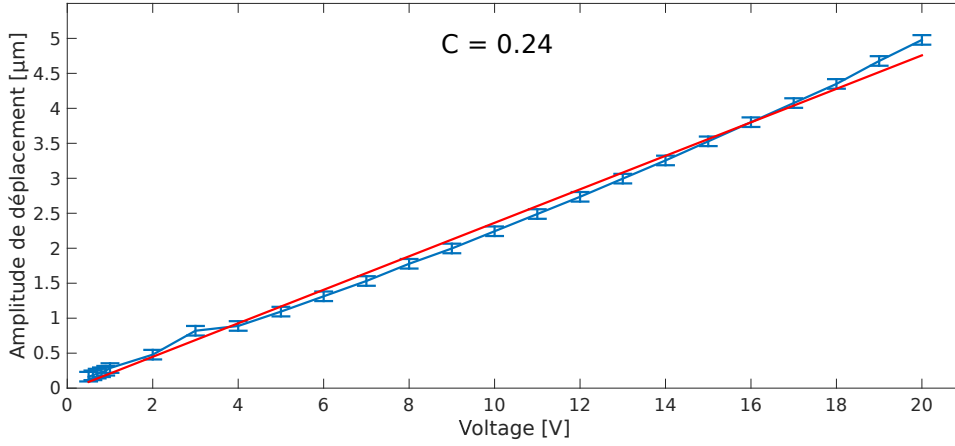


FIGURE 3.5: Déplacement de la membrane du haut-parleur piézo-électrique en fonction de la tension à ses bornes.

Les mesures ont été faites à l'aide d'un capteur capacitif.

Courbe bleue : déplacement mesuré. Courbe rouge : Fit linéaire
 $Displacement = C \times Tension$

Correspondance entre Amplitude en microns et Intensité acoustique en dB La majorité des études menées sur les réponses des poissons à des stimulations acoustiques utilisent pour décrire leurs vibrations l'intensité acoustique exprimée en décibels (dB). Cependant, plusieurs articles ont récemment mis en lumière les différences entre les seuils de réponses obtenus en considérant l'intensité acoustique calculée à partir de l'accélération (déplacement des particules d'eau), et celle calculée à partir de la pression [95] [96]. Ignorant le champ de déplacement de particules précis et les ondes de pression dans le gel d'agar maintenant la larve, nous avons préféré rester prudents quant aux unités employées, et les vibrations seront uniquement décrites par les amplitudes dans nos expériences. Néanmoins, nous avons quand même vérifié que les seuils de réponse que nous mesurons sont en accord avec la littérature : l'intensité acoustique s'écrit

$$L = 20 \log_{10} \left(\frac{a}{a_0} \right)$$

où a est l'accélération des particules d'eau et a_0 l'accélération de référence fixée à $10^{-6} m/s^2$. Pour notre vibration sinusoïdale, on obtient pour l'accélération maximale :

$$a = 4d\pi^2 f^2$$

où d est l'amplitude de la vibration et f sa fréquence (750 Hz). Nous obtenons donc l'expression de l'intensité acoustique en fonction de l'amplitude du déplacement d du haut-parleur :

$$L = 20 \log_{10}(4d\pi^2 f^2)$$

Pour des valeurs de d comprises entre 0.05 μm et 5 μm , les intensités acoustiques exprimées en dB vont de 121 dB à 161 dB. Les seuils de réponse mesurés sur des larves de poisson-zèbres par Zeddies *et al.* se trouvant, pour une fréquence de 750 Hz, un peu en-dessous de 150 dB [94], nos stimulations devraient bien nous permettre d'observer l'apparition de réponses lorsque l'amplitude du mouvement du haut-parleur augmente.

Déclenchement des stimulations

Les stimulations auditives imposées à la larve de poisson-zèbre sont déclenchées par le programme LabVIEW qui gère également l'acquisition d'images. Les *commandes* passent par une connexion RS232, avec un temps de latence d'environ 200 *ms* (la valeur de la tension est changée entre deux stimulations), tandis que les *déclenchements* des stimulations, une fois la commande transmise au Générateur Basses Fréquences, passent par la carte d'acquisition et de contrôle National Instruments, par le biais de TTL synchronisés avec les acquisitions d'images.

Les vibrations provoquées par les stimulations peuvent induire des petits mouvements de la larve, toutefois suffisants pour brouiller l'image. C'est pourquoi les stimulations sont toujours déclenchées lorsque la couche la plus dorsale de la larve est imagée, puisque l'image est de toute façon sacrifiée (cf figure 3.3).

3.2.3 Description des protocoles

Pour conclure sur la présentation du système d'observation et de stimulation, voici un aperçu des deux types d'expériences présentées dans la suite du chapitre. Ce ne sont pas les seuls protocoles à avoir été testés, mais ce sont ceux sur lesquels nous nous sommes attardés, d'une part parce qu'ils semblaient constituer des résultats préliminaires importants, d'autre part en raison de leurs similitudes avec des expériences réalisées au Laboratoire Jean Perrin par Sébastien Wolf sur les réponses neuronales de la larve de poisson-zèbre à des stimulations visuelles [32].

Toutes les expériences décrites ci-dessous sont réalisées à une fréquence d'acquisition globale de 20 *Hz*, sur 10 couches espacées de 8 μm , donc 2 images par seconde pour chaque couche (cf. figure 3.6). Cette fréquence d'acquisition est suffisante pour appréhender les dynamiques de notre rapporteur calcique GCaMP6f, qui a un temps de décroissance d'environ 600 *ms*, pour un temps de montée de l'ordre de la centaine de millisecondes [11].

Les stimulations sont quant à elles générées toutes les 10 secondes, afin de s'assurer que les signaux calciques dûs à l'activité évoquée par des stimulations successives ne se recouvrent pas, et de laisser une fenêtre d'activité spontanée (quantité qui sera évaluée pour chaque neurone et comparée à l'activité évoquée) après chaque stimulation. La figure 3.7 présente une trame temporelle des deux protocoles de manipulation.

Les expériences durent un peu plus de 30 minutes, pour 33200 images, ce qui permet de stimuler 165 fois la larve, selon une routine dépendant du type d'expérience choisi :

Expériences de type 1 : Stimulation variable Le haut-parleur étudié plus haut, couplé au Générateur Basses Fréquences, peut émettre des vibrations dont l'amplitude varie sur 2 décades (déplacement de la membrane de $0,05 \mu m$ à $5 \mu m$ (cf. figure 3.5). Le premier type d'expérience réalisées a donc naturellement été de soumettre la larve de poisson-zèbre à des stimulations d'amplitudes différentes, dans un ordre aléatoire. Cela permet dans un premier temps de décrire les réponses neuronales en terme de populations de neurones plus ou moins sensibles.

Les 165 vibrations générées pendant cette expérience sont réparties en 15 valeurs, chaque valeur étant répétée 11 fois, et l'ordre des stimulations est aléatoire afin d'éviter tout biais dû à une éventuelle habituation des larves aux stimulations (cf. partie 3.4.3).

Expériences de type 2 : Stimulations identiques Dans un deuxième temps, nous nous sommes penchés sur les différents comportements que peuvent présenter les populations de neurones sensibles à la stimulation pour un même niveau acoustique. Les larves ont donc, dans ce protocole, été soumises à de nombreuses reprises à une stimulation de même amplitude, choisie pour être un niveau "seuil", d'après les expériences de type 1. Les 165 stimulations ont donc une amplitude identique, fixée à $1 \mu m$.

Fréquence des stimulations acoustiques La fréquence des vibrations générées par le haut-parleur est fixée, pour l'ensemble des expériences, à 750 Hz. Il s'agit de la fréquence qui a donné les résultats les plus probants lors des expériences préliminaires, lesquelles ne nous ayant d'ailleurs donné aucune indication sur une quelconque tonotopie des zones cérébrales observées.

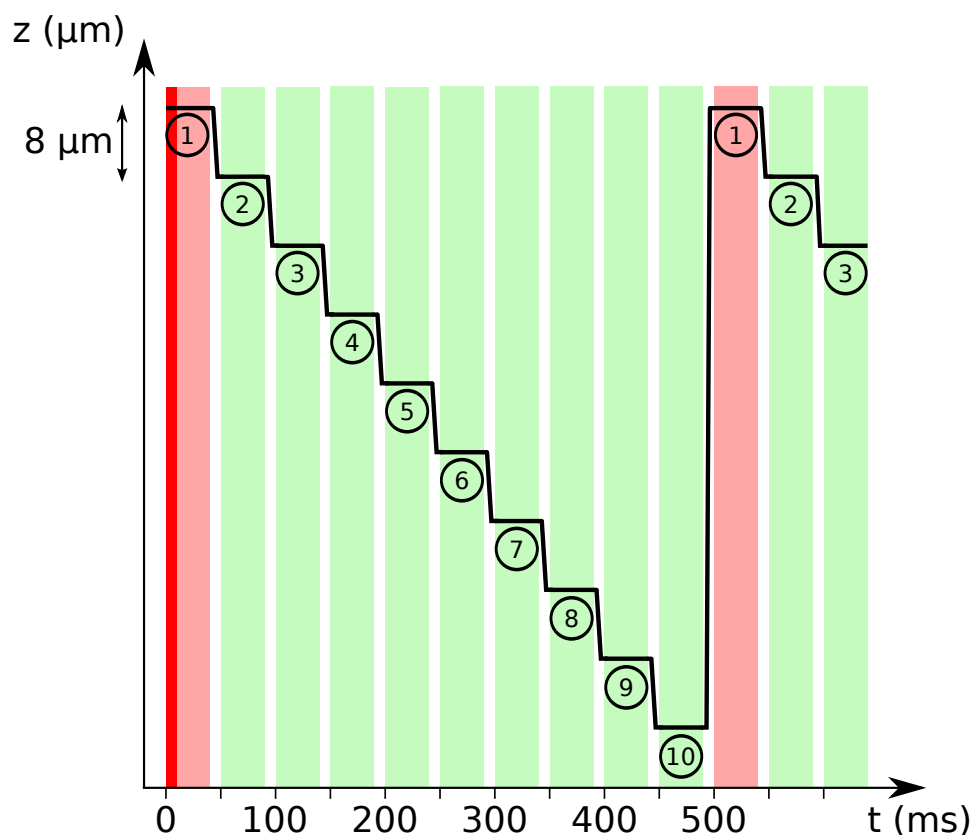


FIGURE 3.6: Schéma temporel d'un cycle d'acquisition d'image :
 Le déplacement de l'objectif d'observation, tracé en noir, est synchronisé avec le mouvement vertical de la nappe laser.
 Le temps d'exposition de chaque image est de 40 ms , les 10 ms entre chaque image laissent le temps à l'objectif de se déplacer.
 Les images de la première couche sont prises juste après un mouvement de grande amplitude de l'objectif occasionnant un déplacement d'eau qui rend l'image floue. Pour cette raison, les stimulations, dont les vibrations peuvent également détériorer l'image, sont également envoyées quand la couche 1 est illuminée (Marque rouge - cf figure 3.7). L'origine des temps est arbitraire.

3.3 Présentation des méthodes d'analyse

A partir des expériences réalisées selon les protocoles décrits précédemment, les films ont pu être analysés grâce à une suite d'algorithmes de traitement d'image pour donner des signaux de fluorescence par neurone. Ces signaux ont à leur tour été la matière première pour plusieurs programmes permettant de transformer ces signaux de fluorescence bruts en valeurs rendant compte de la réponse des neurones, afin de pouvoir étudier la dynamique de l'activité neuronale évoquée par nos stimulations à 10 altitudes

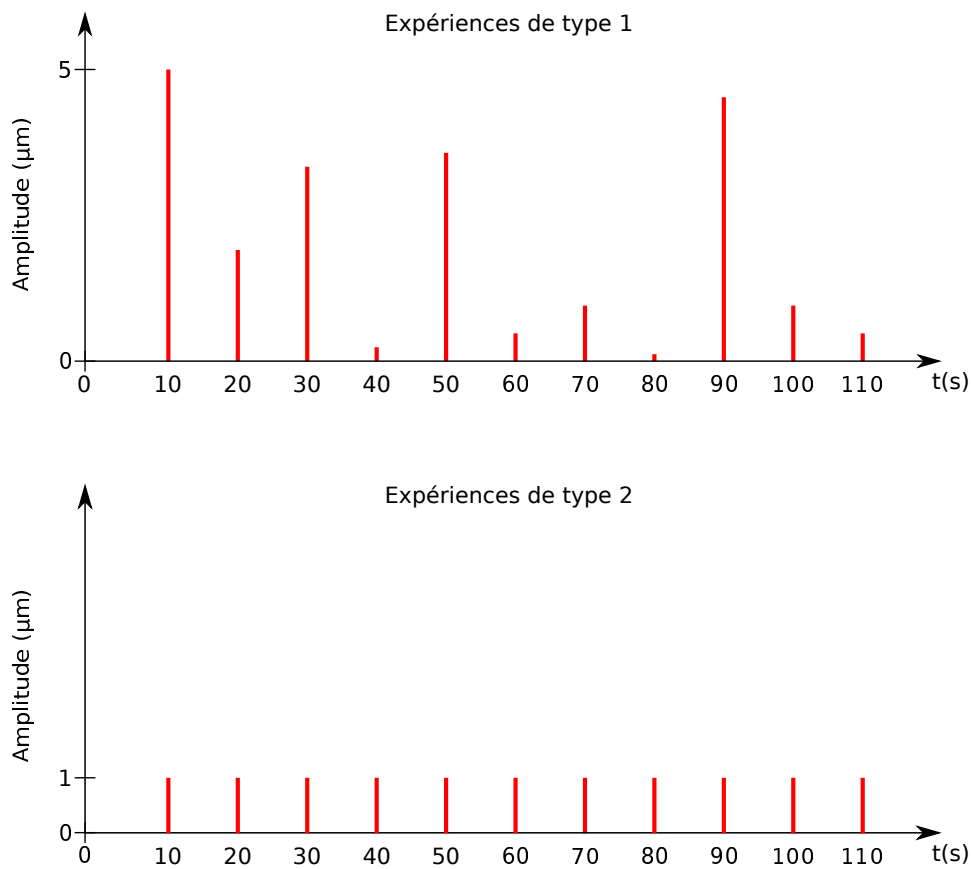


FIGURE 3.7: Schéma des stimulations présentées aux larves suivant les deux types d'expériences.

Type 1 (Haut) : Les larves sont soumises à des vibrations dont l'amplitude varie sur une plage de deux décades, aléatoirement. Type 2 (Bas) : Les vibrations ont toutes la même amplitude, fixée à $1 \mu m$

simultanément.

Dans un premier temps seront décrites les étapes permettant d'obtenir des signaux de fluorescence à partir des films d'activité, et comment ces signaux de fluorescence sont convertis en grandeurs caractéristiques de la force de la réponse. Puis nous verrons comment, à partir de ces nouveaux signaux, nous avons tenté de rendre compte le mieux possible des comportements de chaque neurone lors de leurs réponses aux stimulations, et enfin comment s'est effectuée une sélection des neurones d'intérêt étudiés par la suite.

Pour finir, une autre méthode d'analyse sera présentée. Celle-ci est plus qualitative : elle permet de construire des films mettant en exergue les zones

d'activité neuronale recrutées par les stimulations, avec un minimum de traitement d'image, pour rester au plus près des données brutes. Ce sont néanmoins ces films qui ont constitué les premiers résultats dont nous sommes servis pour concevoir les protocoles, et qui ont permis de vérifier que les résultats plus quantitatifs obtenus lors des autres étapes d'analyse étaient en adéquation avec les images d'origine.

3.3.1 Des images brutes à un signal de fluorescence

La première étape du traitement de données consiste en un programme de traitement d'images qui est resté, dans les grandes lignes, le même que celui décrit par Thomas Panier dans sa thèse [30]. En voici un résumé, décrivant comment, à partir d'un film d'une expérience, on peut construire les signaux de fluorescence de tous les neurones de chaque couche étudiée.

Partage des images entre les différentes couches

Les films récupérés une fois les expériences terminées comportent 33200 images, prises dans un ordre décrit par la figure 3.6. Il est donc en théorie simple de séparer les images en 10 paquets de 3320 images, chaque paquet correspondant à une altitude. Cependant, il arrive que l'acquisition ne se passe pas parfaitement, et que certaines images soient sautées. En ce cas, un programme a été développé pour pallier ce problème : à partir des images appartenant à la même couche, situées juste avant et juste après l'image manquante, une image moyenne est construite et vient remplacer l'image manquante.

Traitement d'image : Segmentation des neurones

N.B. : Tout ce paragraphe, ainsi que le suivant, décrivent l'étude d'une seule couche.

Tout d'abord, il s'agit de délimiter à la main une ROI pour que l'algorithme de traitement d'image puisse séparer le fond (*background*) de la partie de l'image contenant la larve. La figure 3.8 présente un exemple de ce procédé. Sur l'image présentée, la taille des pixels est de $0,4 \mu m$.

La figure 3.9 présente les routines successives qui permettent de définir, à partir de l'image moyenne de la couche considérée, les contours de chaque neurone. Voici un bref descriptif de chaque étape :

- A \rightarrow B : Moyenne des images réalisée sur tout ou partie des images de la couche. Pour gagner du temps, les images moyennes sont généralement calculées en prenant une image sur 100, ce qui suffit à donner des

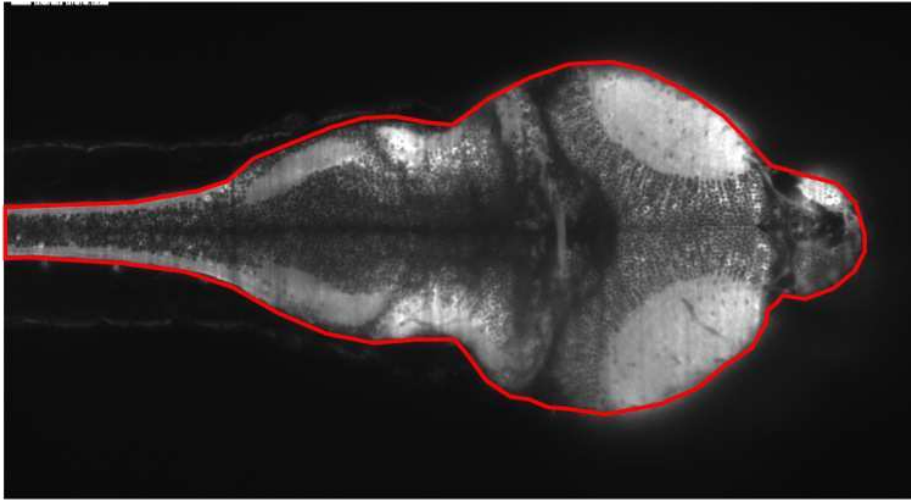


FIGURE 3.8: Exemple d'image obtenue. Création manuelle d'une ROI pour définir le *background*. Ce travail est fait sur une image brute, avant tout traitement d'image.

images avec des neurones assez définis pour permettre les étapes suivantes. Il arrive que la larve dérive, si l'agar glisse ou se dilate/contracte. Dans ce cas les déplacements globaux sont corrigés pour le calcul de l'image moyenne, par corrélation avec la première image.

- B \rightarrow C : Filtrage gaussien de l'image moyenne, avec un masque de taille 5x5 pixels et d'écart-type 2,5 pixels. Les neurones apparaissant avec une taille en général supérieure à 10 pixels, ce masque permet de se débarrasser d'une partie du bruit sans pour autant rendre flous les contours des neurones.
- C \rightarrow D : Après définition des neuropiles (voir paragraphe suivant) : Etirement du contraste local : la valeur de chaque pixel est normalisée en fonction des maxima et minima locaux (fenêtre de 5x5 pixels).
- D \rightarrow E : Algorithme de *Watershed* : les intensités des pixels sont considérées comme des altitudes, délimitant des vallées qui constituent les neurones, en couleur sur l'image présentée.

On obtient donc, à partir de l'image moyenne de l'expérience, des objets correspondant aux neurones repérés par l'algorithme sur la couche considérée. Ils sont repérés par les centroïdes des vallées définies lors de l'étape D \rightarrow E du traitement d'images. Pour chaque neurone, on sauvegarde également la liste des pixels dont il est constitué.

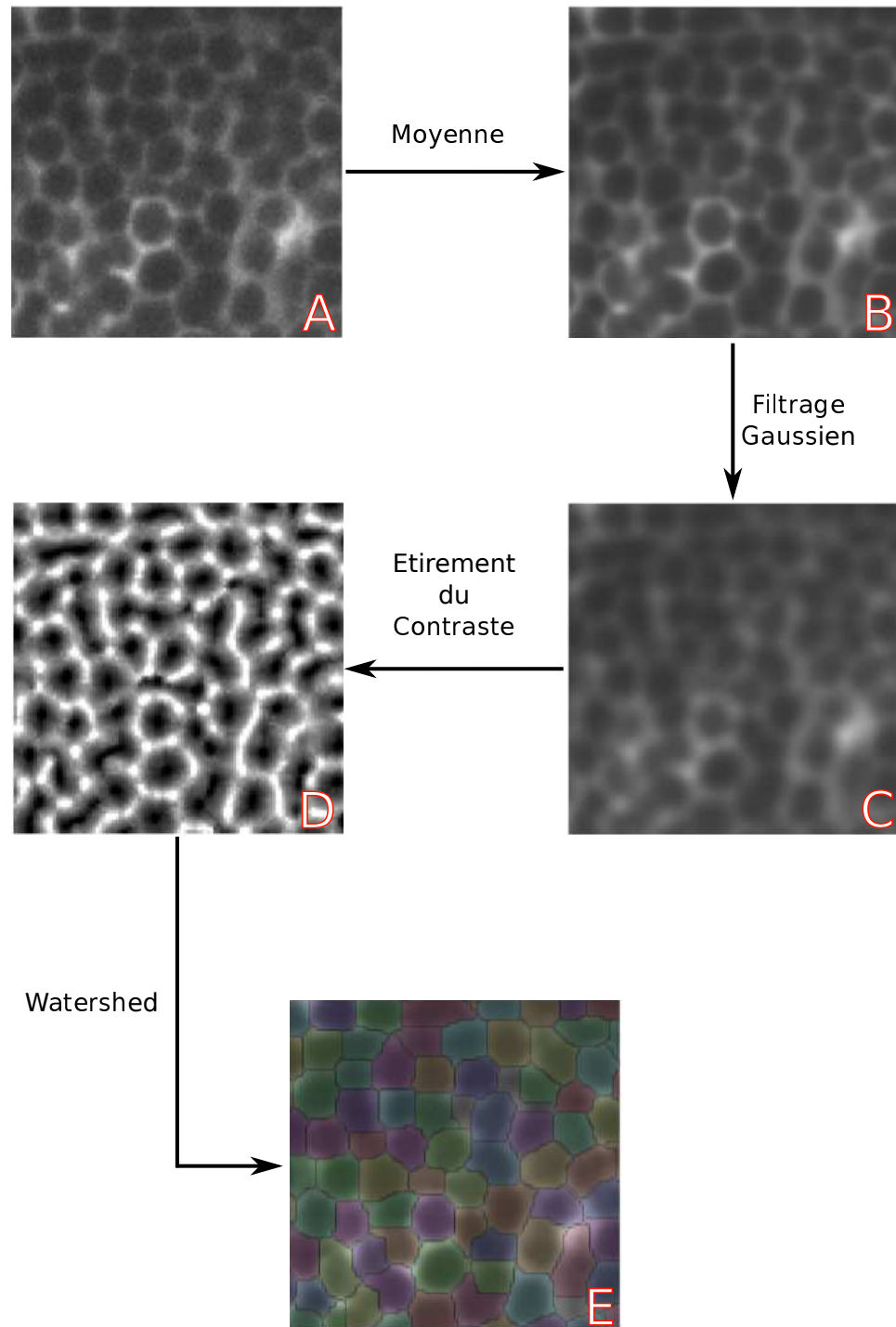


FIGURE 3.9: Description des étapes de l'algorithme de traitement d'images : de l'image brute (A) au sectionnement des neurones (E)

Traitement d'image : Segmentation des neuropiles

A ce stade, il est nécessaire de préciser le sort réservé aux neuropiles, cette matière blanche constituée d'axones et de dendrites, qui sont présents sur toutes les couches étudiées. Les axones exprimant la molécule GCaMP6f, leur fluorescence nous informe également sur les signaux qu'ils transportent.

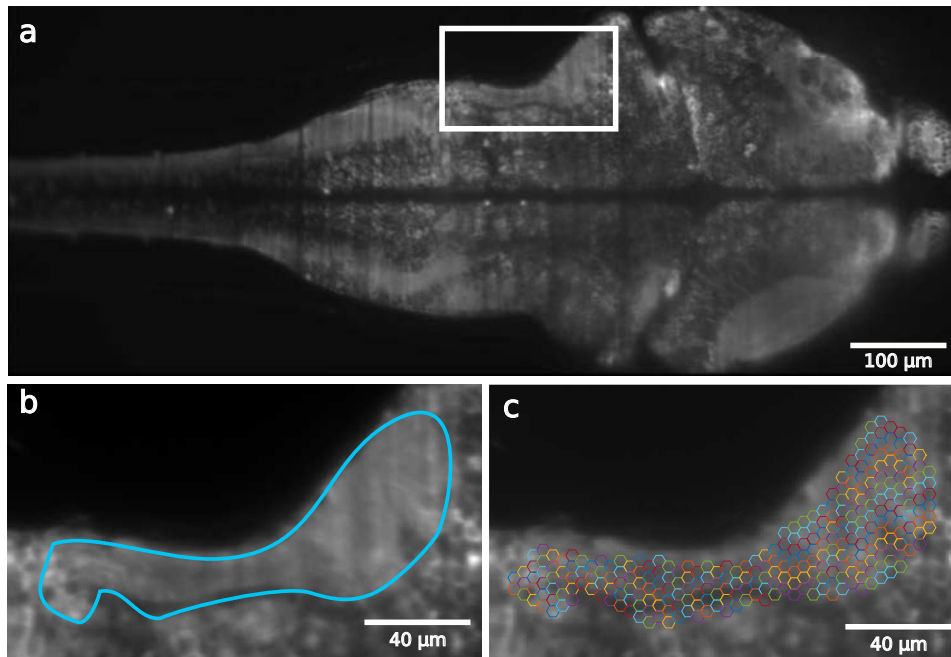


FIGURE 3.10: Exemple de segmentation des neuropiles :

- (a) Zone étudiée (encadré blanc)
- (b) Délimitation du neuropile
- (c) Hexagones d'une aire de 85 pixels constituant le pavage du neuropile

Comme il est impossible de repérer des fibres nerveuses uniques et que le neuropile apparaît comme un amas de matière fluorescente, il a été décidé de le séparer en régions assez petites et de taille égale, afin d'établir un pavage relativement précis de la zone. Leur définition est semi-manuelle et intervient après l'étape de moyenne d'image. Il faut d'abord définir à la main un contour, qui contient la partie du neuropile (figure 3.10 (b)). Puis l'aire ainsi délimitée est découpée en tuiles hexagonales de taille choisie par l'utilisateur (étape 2), leur surface étant typiquement d'environ 80-100 pixels. Chaque hexagone est alors traité par la suite exactement comme un neurone défini par le processus décrit précédemment.

N.B. : Dans la suite, à chaque fois que l'on utilisera le terme *neurone*, ce sera pour évoquer sans distinction les véritables neurones issus de l'algo-

rithme de *watershed* ou les hexagones des neuropiles.

3.3.2 Traitement du signal : extraction du signal de fluorescence et inférence de spikes

Une fois les neurones définis à l'aide des méthodes décrites ci-dessus, il faut, à partir du signal brut de fluorescence issu de l'image, rendre compte autant que possible des trains de potentiel d'action réellement à l'œuvre dans les neurones étudiés.

La figure 3.11 donne un exemple des étapes de traitement du signal permettant d'accéder, aussi précisément que possible, à l'information reçue par les neurones en termes de trains de potentiels d'action. Ces courbes sont issues d'une expérience de type 2, c'est-à-dire que les stimulations sont envoyées toutes les 10 secondes (toutes les 20 images), avec une amplitude constante fixée à $1 \mu m$.

Le signal de fluorescence d'un neurone à chaque pas de temps est défini comme la moyenne de l'intensité des pixels desquels il est composé (3.11 (a), courbe bleue). Ce calcul, fait sur toutes les images du film correspondant à la couche, contient une étape de correction de la dérive à chaque pas de temps, toujours par corrélation d'images. La courbe de dérive en x et en y est conservée pour la détection d'artefacts de mouvements (voir plus loin). Dans un premier temps, une *ligne de base* $b(t)$ du signal est calculée en sélectionnant en chaque point le 8^{ème} centile des valeurs de fluorescence comprises dans une fenêtre de 30 secondes (60 images ici) autour de ce point. Cette ligne de base correspond au niveau de fluorescence du neurone, indépendamment de son activité (3.11 (a), courbe rouge).

A partir de cette ligne de base et du signal de fluorescence, on calcule une quantité notée DFF dans la suite, qui correspond à la variation relative d'intensité de fluorescence, qui rend seulement compte de l'activité du neurone : $\frac{\Delta F}{F} = \frac{F(t)-b(t)}{b(t)}$. Cette grandeur est représentée en figure 3.11 (b) ; elle suit les variations aux temps courts de la courbe de fluorescence, mais les périodes où le neurone ne montre pas d'activité sont en moyenne à zéro. De plus, les DFF de plusieurs neurones peuvent être comparés, à l'inverse de leur fluorescence, dont la valeur au repos varie d'un individu à l'autre.

Enfin, un programme d'*inférence de spikes* a été développé par Jérôme Tubiana, alors en stage de Master 2 dans notre équipe, permet de traduire les traces temporelles d'activité (DFF) en spikes dont l'amplitude est proportionnelle à la fréquence du train de potentiels d'actions reçus par le neurone considéré. Ces spikes inférés sont exprimés en multiples de σ , où σ est une mesure du bruit intrinsèque du neurone (calculé sur son activité spon-

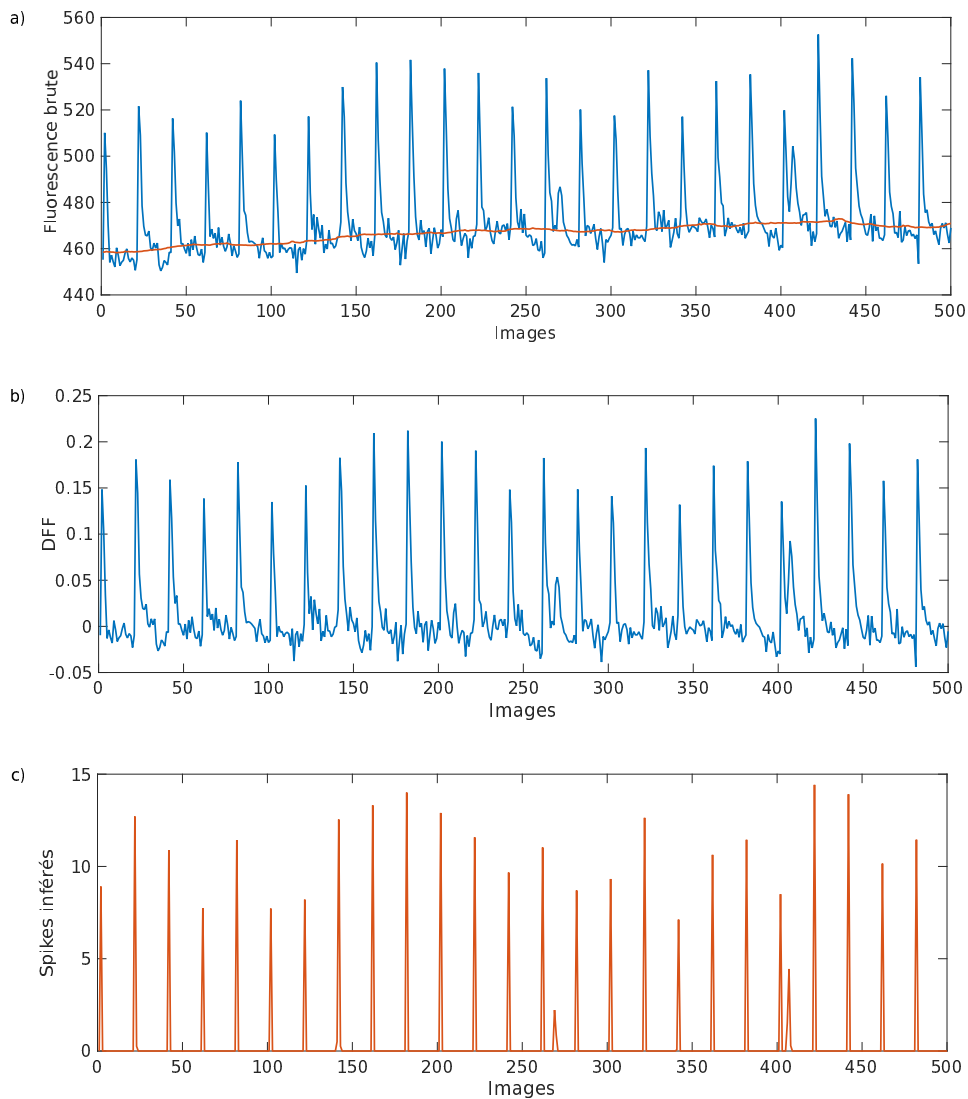


FIGURE 3.11: Description des étapes de l'extraction du signal à partir de la fluorescence de chaque neurone :

- a) Calcul de la *ligne de base* (rouge) à partir du signal de fluorescence (bleu)
- b) Résultat du calcul de $DFF = \frac{F-b}{F}$ pour le signal présenté au-dessus
- c) Résultat du programme d'inférence de spikes.

tanée). Grossièrement, cela permet d'évaluer la fiabilité d'un évènement : au-delà d'une valeur de 1, on considère que le spike rend bien compte d'une dépolarisation de la membrane du neurone.

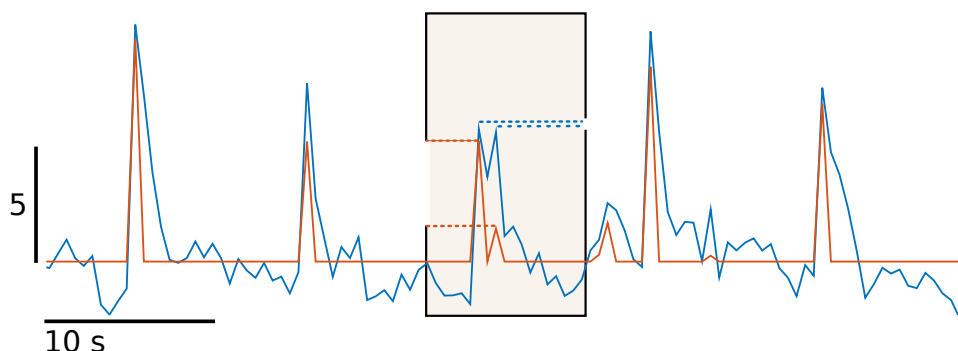


FIGURE 3.12: Intérêt de l'inférence de spikes : le 3^{ème} pic d'activité est suivi d'un deuxième spike. L'inférence de spike permet de prendre en compte le niveau initial de DFF , et donc ne pas considérer les deux pics d'activité successifs comme étant d'amplitude égale.

Intérêt de l'inférence de spike Sur la figure 3.11, on peut voir que l'inférence de spikes présente des pics d'activité aux mêmes endroits que ceux de la courbe de DFF , et que leur hauteur est corrélée à celle des pics de DFF . Il semble donc que l'utilisation de ce programme n'apporte pas tant d'information sur l'activité du neurone, et qu'en appliquant seulement un seuil sur les pics d'activité, on soit en mesure de caractériser les différentes réponses du neurone. Cependant, l'intérêt du programme d'inférence apparaît lorsque le neurone présente un pic d'activité alors que la décroissance du rapporteur calcique (dont le temps de descente est d'environ 1 seconde) n'est pas achevée, et donc que DFF n'est pas retombé à sa valeur au repos, c'est-à-dire zéro. La figure 3.12 montre que l'inférence prend en compte la forme du signal avant le pic d'activité, et ainsi diminue l'importance de certains pics survenant dans un laps de temps inférieur à 1 seconde après un premier pic.

N.B. : Dorénavant, lorsqu'on parlera de *réponse* d'un neurone à une stimulation, on se référera à la valeur de spike inférée pour cette stimulation.

3.3.3 Détection des artefacts liés au mouvement

L'effet de l'agent paralysant mélangé au gel d'agar qui retient la larve prisonnière peut s'estomper au fil de l'expérience. Même si la larve est toujours prisonnière et reste globalement immobile, il arrive qu'elle soit prise de violentes convulsions lors des dernières images. Ces mouvements de grande amplitude peuvent constituer des artefacts pour nos programmes de traitement d'image et d'inférence de spikes, et doivent être détectés. Fort heureusement, la dérive de l'image est calculée lors du procédé d'extraction du signal de fluorescence, sous la forme de deux vecteurs donnant le décalage

de l'image par rapport à la première image au cours du temps, en x et en y.

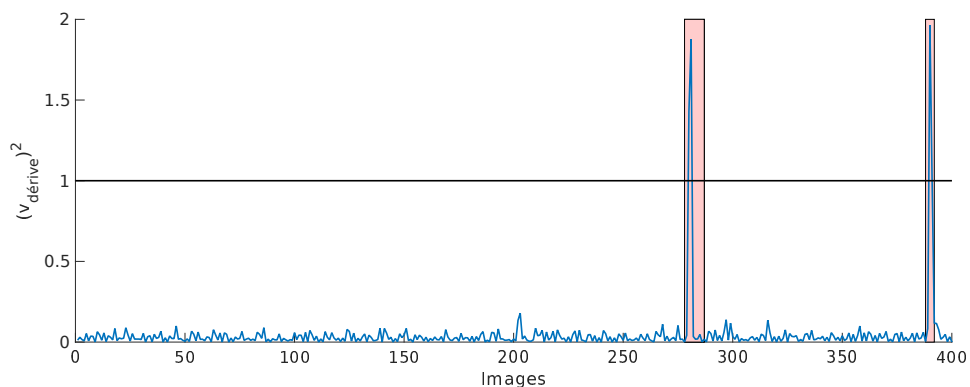


FIGURE 3.13: Norme de la vitesse de dérive en fonction du temps. Les pics correspondant aux convulsions sont repérés lorsqu'ils dépassent un seuil (ici égal à 1). Les rectangles rouges englobent les images ignorées pour le reste du traitement.

Pour se débarrasser des artefacts dûs aux convulsions de la larve, on s'intéresse à la dérivée temporelle de la norme de la vitesse de dérive : $v^2 = \sqrt{\left(\frac{dx}{dt}\right)^2 + \left(\frac{dy}{dt}\right)^2}$ exprimée en pixels/image. Les convulsions sont facilement repérables (voir figure 3.13)

3.4 Résultats expérimentaux

Cette partie présente les résultats obtenus en suivant les protocoles expérimentaux et les techniques d'analyse décrits précédemment. Les deux types d'expériences, chacune réalisée sur plusieurs individus, ont permis d'identifier plusieurs groupes de neurones à partir de leurs réponses aux stimulations auditives.

3.4.1 Morphologie

Dans un premier temps, nous nous sommes servis des expériences de type 2 pour localiser les zones présentant des réponses dans les zones du cerveau que nous pouvons observer. Les images tirées des *films d'activité* (voir la partie 3.4.2 décrivant la création de ces films) permettent en effet, à l'aide d'une moyenne sur de nombreuses occurrences d'une même stimulation, d'obtenir un signal fort mettant bien en exergue les régions cérébrales activées par les vibrations. Nous allons voir comment les images issues de plusieurs expériences ont pu être fusionnées afin d'obtenir une carte en volume des zones appartenant au circuit neuronal actif lors de nos stimulations.

Utilisation de CMTK

Le programme CMTK, pour *Computational Morphometry ToolKit*, développé depuis des années au sein du NITRC (Neuroimaging Informatics Tools and Resources Clearinghouse) pour l'IRM, permet d'utiliser plusieurs jeux de données pour les fusionner à partir d'un modèle, à l'aide de transformations plus ou moins simples. Cet outil a été exploité par la suite pour identifier des régions à partir de cerveaux de drosophile [97], et a récemment été utilisé pour construire le *Z-Brain viewer*, atlas interactif développé au sein du Engert Lab par Owen Randlett permettant de naviguer dans le cerveau d'une larve de poisson-zèbre âgée de 6 jours [98], s'appuyant sur une base de données contenant de nombreuses colorations à partir de différents gènes ainsi que les contours en volume de régions cérébrales bien définies.

Afin de tirer parti de cet atlas, qui offre la possibilité de superposer nos propres jeux de données aux cartes appartenant à la base existante et donc de faire correspondre les régions où nous détectons de l'activité à celles pouvant être affichées sur l'interface de l'atlas, il a fallu fusionner à l'aide de CMTK plusieurs de nos expériences. Pour cela, une des expériences est choisie comme cerveau-référence, puis, à l'aide des *scans* (images volumiques) haute résolution de l'ensemble du cerveau (800 couches espacées de 0.4 μm afin d'obtenir des voxels cubiques) réalisés pour chaque larve étudiée, les transformations, affines et non-linéaires, nécessaires pour "calquer" les images sur le *scan* de référence sont calculées. Ces dernières sont ensuite

appliquées à des paquets d'images contenant l'activité cérébrale sur la zone de cerveau enregistrée. A l'origine, nous disposons de 10 couches espacées de 8 μm , mais pour avoir un aperçu en trois dimensions des zones actives, nous utilisons la fonction *resize* développée par Damien Garcia [?] pour Matlab, qui réalise une interpolation à l'aide de transformées en cosinus discrètes pour créer des images entre ces couches. De la sorte, l'activité peut être superposée aux *scans* pour une visualisation 3D des zones d'activité.

Reproductibilité Une fois les transformations appliquées à ces ensembles d'images d'activité, il devient possible d'observer les zones d'activité évoquée sur plusieurs expériences et donc de vérifier la reproductibilité de nos résultats. Comme on peut le constater sur la figure 3.14, où deux cartes d'activité obtenues sur deux larves âgées de 6 jours ont été fusionnées, on voit une forte similitude entre les zones activées, montrant une stéréotypie des voies neuronales. Les zones actives sur les deux expériences ne sont pas exactement superposées, les différences morphologiques entre deux individus ainsi que leurs orientations variables au sein du dispositif d'observation ne pouvant être totalement gommées par les algorithmes de CMTK.

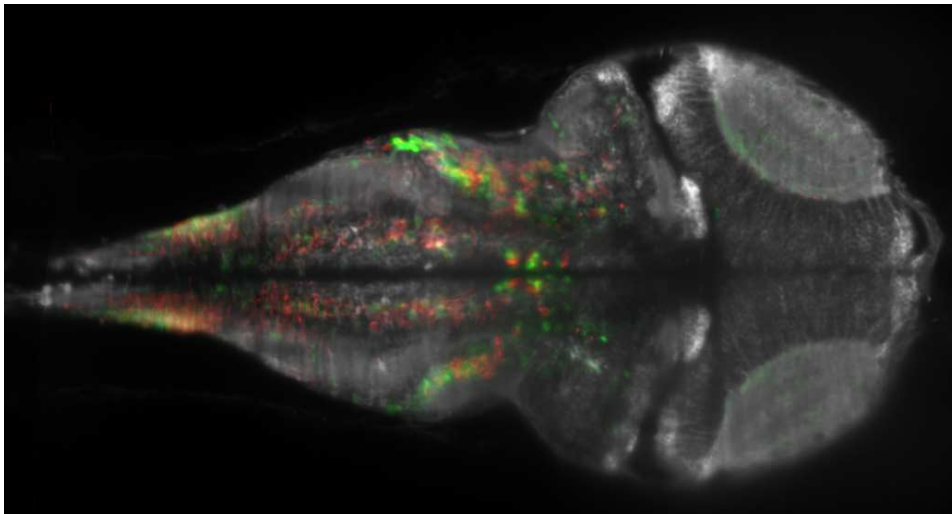


FIGURE 3.14: Tranche issue d'une fusion entre deux expériences d'activité évoquée chez deux larves de 6 jours, les régions actives dans chaque expérience étant affichées en vert et en rouge.

Moyenne des zones d'activité sur plusieurs expériences Enfin, afin d'obtenir des données aussi lisibles que possible, nous pouvons réaliser une moyenne des images présentant l'activité sur ces expériences, afin de mettre

en valeur les zones activées par la stimulation. Le résultat est, comme précédemment, un volume dont les zones actives sont colorées. La figure 3.15 présente des coupes orthogonales de ce volume.

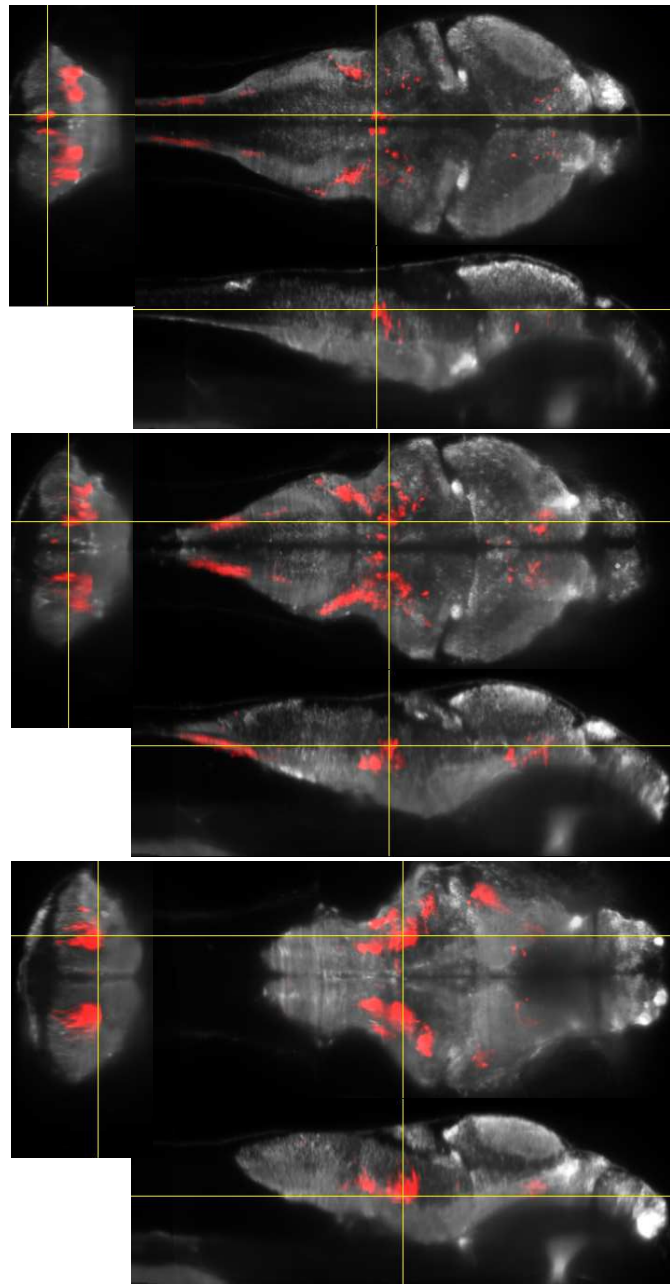


FIGURE 3.15: Trois coupes orthogonales du volume présentant l'activité évoquée par une stimulation à partir de quatre expériences différentes chez des larves de 5 jours, dont les cerveaux ont été recalés sur un des quatre cerveaux, servant de modèle. Pour chaque bloc : en haut à gauche : coupe transverse - en haut à droite : coupe frontale - en bas à droite : coupe sagittale.

Identification de régions cérébrales

A partir des volumes contenant les zones activées par nos stimulations, nous avons tenté de croiser les informations du *Z-Brain Viewer* avec les cartes d'activité que nous pouvions observer, afin d'identifier le mieux possible ces régions actives. Les figures suivantes présentent des coupes à plusieurs altitudes de ces cartes en trois dimensions, avec les noms des régions cérébrales associées, déduites de la littérature et de l'atlas développé par Owen Randlett, contenant les neurones actifs lors des stimulations.

Les régions que nous avons identifiées, par ordre d'apparition, sont :

VIII NE Neurones efférents du VIIème nerf moteur facial et du VIIIème nerf (nerf octavolatéral). Ces neurones seraient les premières projections des ganglions acoustiques (Figure 3.16).

6.7FDhcrtR Neurones sous contrôle du gène 6.7FDhcrtR, dont la coloration a été développée par A.Lacoste *et al.* dans l'étude des *Spiral Fiber Neurons* (voir plus loin). Ces neurones, d'après l'atlas *Z-brain Viewer*, correspondent à une grande partie des neurones présentant une réponse à nos stimulations (Figure 3.16).

CON Caudal Octavolateralis Nucleus : un des noyaux où projettent les neurones du ganglion auditif ((Figure 3.17).

DT Dorsal Thalamus : Partie dorsale du thalamus - les parties plus ventrales de cette partie du cerveau ne sont pas observées dans nos expériences (Figure 3.17).

FNM Fibres Nerveuses Motrices : Fibres nerveuses dont l'activité est associée aux mouvements de queue (Figure 3.17).

MON Medial Octavolateralis Nucleus : un autre noyau où projettent les neurones du ganglion auditif, appartient au cervelet (*cerebellum*) (Figure 3.18).

MVN Medial Vestibular Nucleus (Figure 3.18).

TS Torus Semicircularis : zone du mésencéphale servant de relais avant de projeter dans le Thalamus (Figure 3.19).

SFN (*Spiral Fiber Neurons* en Anglais). Cellules excitatrices des cellules de Mauthner, ces dernières déclenchant des mouvements d'échappement rapides [99] [100] (Figure 3.19).

Les quatre coupes présentées ci-après sont organisées de la plus dorsale à la plus ventrale.

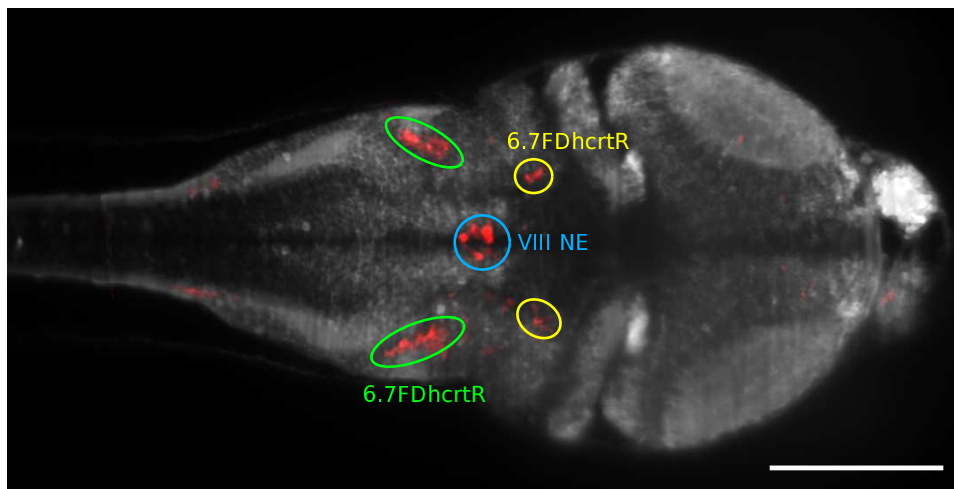


FIGURE 3.16: VIII NE : Neurones efférents du VIIème et VIIIème nerf.
 6.7FDhcrR : partie de la population de neurones colorés chez les mutants
 6.7FRhcrR-Gal4 UAS :Kaede [99].
 Barre d'échelle 80 μm

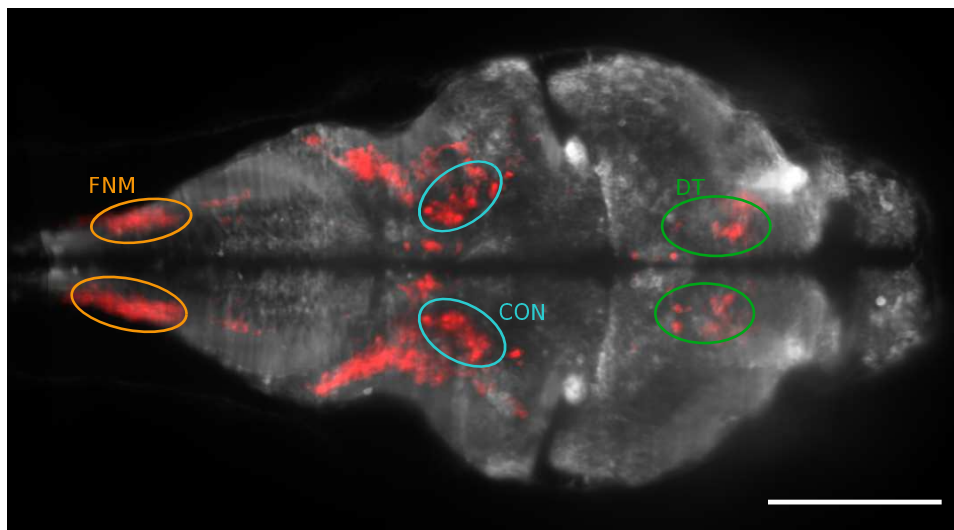


FIGURE 3.17: FNM Fibres nerveuses motrices
 CON Caudal Octavolateralis Nucleus
 DT Dorsal Thalamus
 Barre d'échelle 80 μm

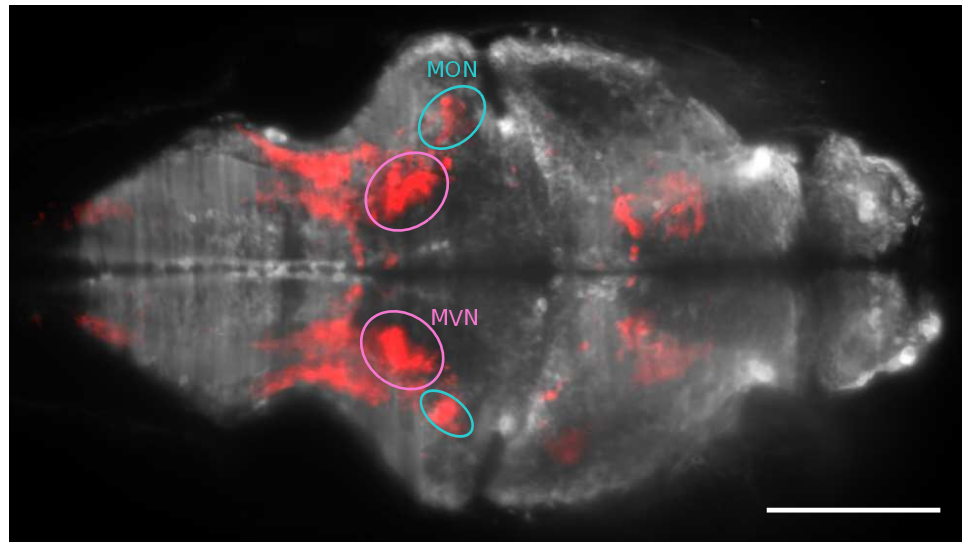


FIGURE 3.18: MVN Medial Vestibular Nucleus
MON Medial Octavolateralis Nucleus
Barre d'échelle 80 μm

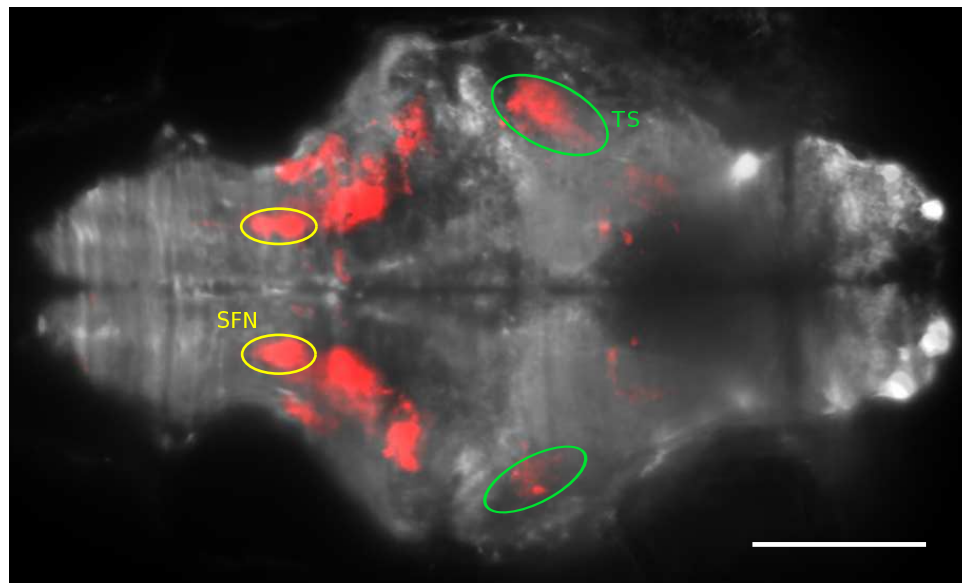


FIGURE 3.19: SFN Spiral Fiber Neurons
TS Torus Semicircularis Barre d'échelle 80 μm

3.4.2 Expériences de type 1 : Courbes de réponse

Pour ce type d'expériences, les larves sont soumises à des stimulations d'amplitude variant entre $0,05 \mu m$ et $5 \mu m$, dans un ordre aléatoire.

Premières observations à l'aide de films d'activité

Conceptions des films d'activité L'idée est d'obtenir, à partir des images brutes, des films grâce auxquels l'activité évoquée lors des stimulations soit visible facilement, pour chaque amplitude de la stimulation (figure 3.20) :

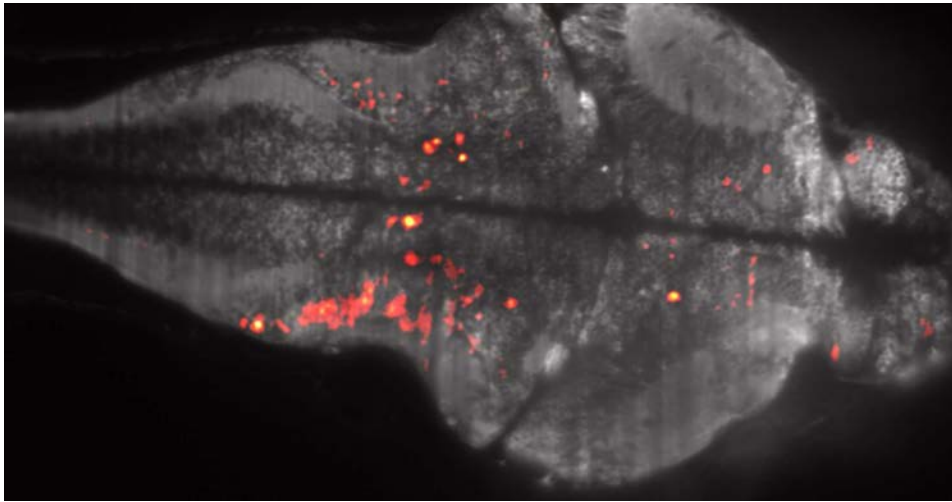


FIGURE 3.20: Exemple d'image obtenue grâce au traitement d'images rapide décrit ici. Les couleurs rendent compte de l'écart de fluorescence des pixels par rapport à l'image de la larve au repos, sur l'image suivant la stimulation, c'est-à-dire 500 ms après la vibration, lorsque l'activité évoquée enregistrée est maximale.

Pour obtenir un film d'activité présentant l'activité cérébrale moyenne sur une des 10 couches imagées, il convient d'abord de choisir combien on désire d'images précédant et suivant la stimulation : on note n_{prec} le nombre d'images avant la stimulation et n_{suiv} le nombre d'images après la stimulation. Pour les expériences présentées ici, on a généralement choisi $n_{prec} = 2$ et $n_{suiv} = 9$. Voici une description des étapes successives aboutissant aux films d'activité :

- Pour chaque valeur V de l'amplitude la stimulation, on relève les instants auxquels le haut-parleur a vibré à l'amplitude voulue $T_{V,i=1..N}$ avec N le nombre d'occurrences de la valeur considérée (*a priori* N est le même pour toutes les valeurs de l'amplitude). On retire de cette

liste les stimulations où l'image a été polluée par un mouvement (cf. paragraphe sur la détection d'artefacts de mouvement).

- Pour chaque indice $n = (-n_{prec}), (-n_{prec} + 1), \dots, 0, \dots, n_{suiv} - 1, n_{suiv}$, on réalise une moyenne de toutes les images d'indices $T_{V,i=1..N} + n$ est effectuée, sur toutes les occurrences i de la valeur V de l'amplitude.
- On dispose alors de $n_{prec} + n_{suiv} + 1$ images moyennées (en général 13 images), qui constituent le film représentatif moyen de l'activité cérébrale évoquée par la stimulation d'amplitude V .
- Cependant, ces images sont difficilement exploitables en raison de la faible différence entre le niveau de fluorescence au repos et niveau de fluorescence d'un neurone actif. C'est pourquoi il est nécessaire de calculer la différence entre chaque image du film et l'image moyennée sur l'ensemble du film pour faire ressortir l'activité (voir figure 3.21). Cette différence est ensuite seuillée afin de ne conserver que l'information sur les réponses des neurones, sans les pollutions dues à un mouvement parasite. Enfin, on calque ces valeurs sur la carte de couleurs *hot* incluse dans MATLAB pour obtenir une image semblable à la figure 3.20.

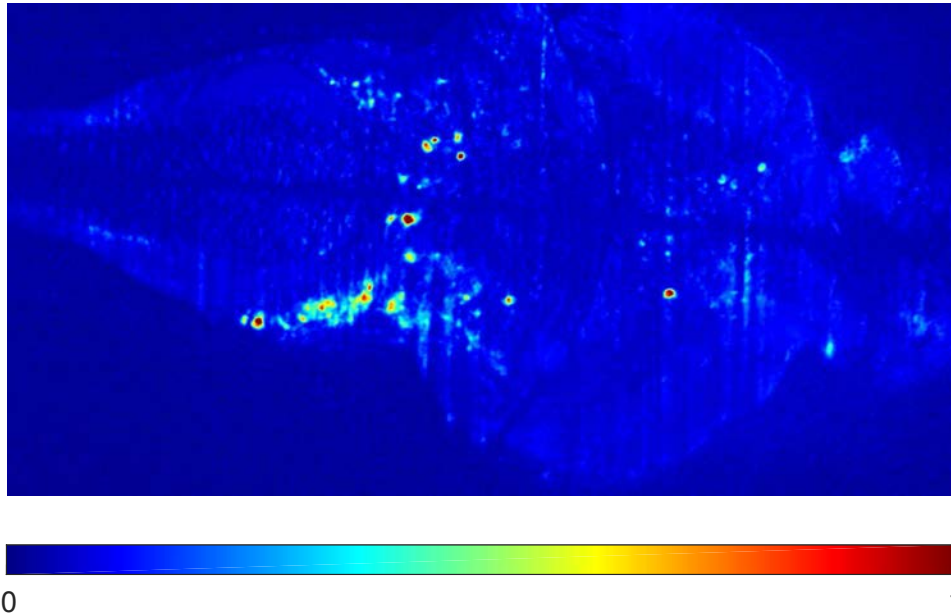


FIGURE 3.21: Différence entre l'image moyennée sur l'ensemble du film d'activité et l'image suivant la stimulation. Les valeurs sont normalisées par la valeur maximale pour plus de clarté.

Les premières données obtenues grâce à ces expériences, une fois transformées en films d'activité, mettent en évidence plusieurs groupes de neu-

rones, recrutés à des amplitudes de vibration différentes. Les figures 3.22, 3.23 et 3.24 présentent, pour 4 expériences distinctes, les cartes d'activité réalisées à partir des films, en prenant l'image juste après la stimulation, et ce pour 3 valeurs de la stimulation. En résumé, voici un aperçu des zones du cerveau dans lesquelles on observe une réponse :

Stimulation faible $V = 0.5\mu m$ Les neurones présentant une réponse aux faibles stimulations sont majoritairement situés dans la *medulla oblongata* pour la partie la plus dorsale du cerveau (voir figure 3.22 - a), dans les régions inférieures du rhombencéphale et du tectum en ce qui concerne les couches plus ventrales (voir figure 3.22 - c), ainsi que dans des régions proches de l'hypothalamus.

Stimulation moyenne $V = 1.5\mu m$ De nouveaux neurones sont recrutés dans la partie la plus dorsale du hindbrain (*medulla oblongata*), en particulier dans les zones latérales (voir figure 3.23 - a), ainsi que dans des zones cérébrales excentrées, pouvant appartenir au *torus semicircularis*. Plus profond dans le cerveau, les zones activées sont à peu près les mêmes, mais les signaux enregistrés sont plus forts (voir figure 3.23 - c).

Stimulation forte $V = 3.75\mu m$ Les signaux des neurones déjà recrutés par des stimulations d'amplitudes inférieures sont encore plus forts. De plus, de nouvelles zones sont maintenant actives, essentiellement des régions reliés à l'activité motrice des larves (voir figure 3.24).

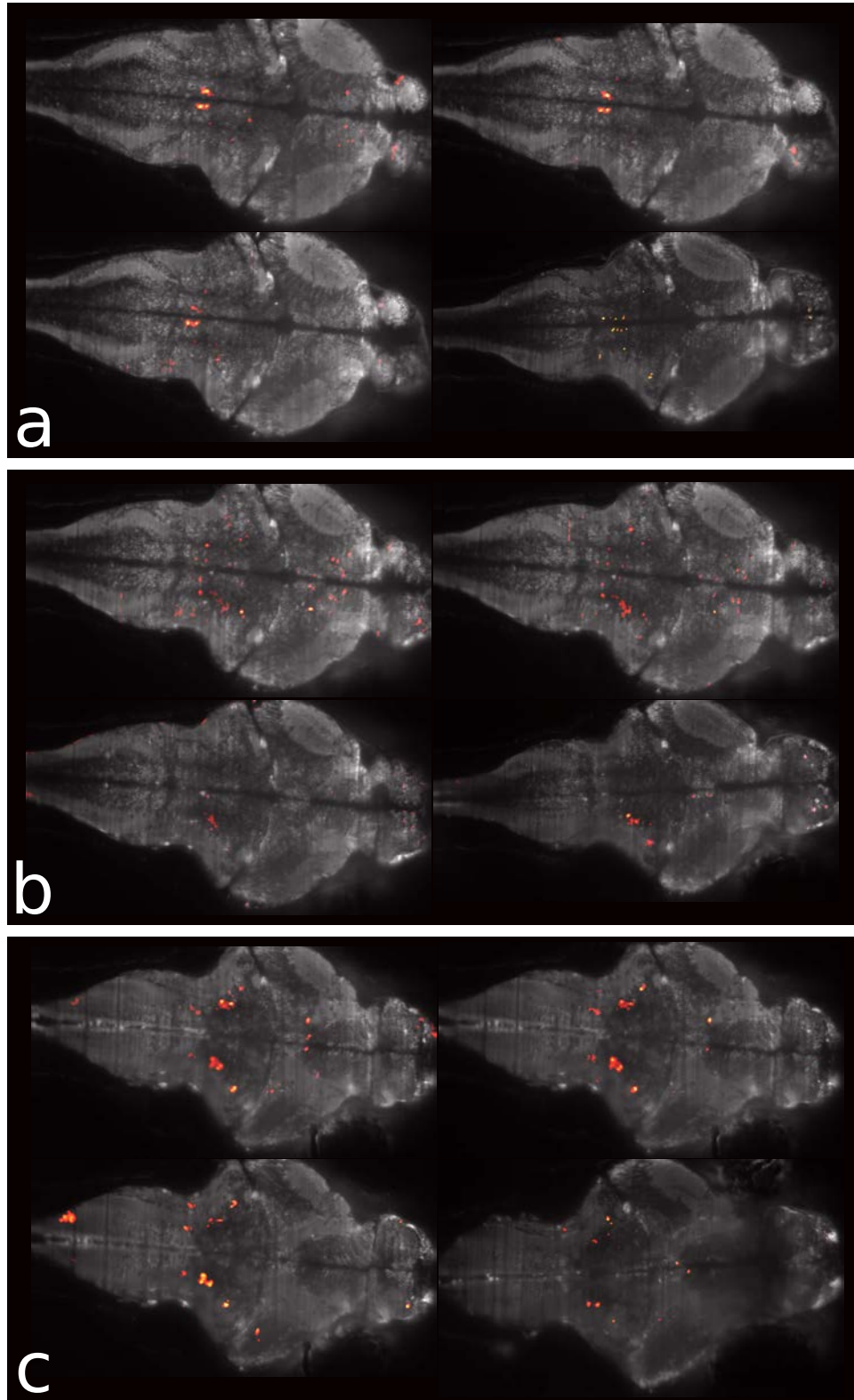


FIGURE 3.22: Zones neuronales activées pour des stimulations de faible amplitude ($V = 0.5\mu m$).
a) Profondeur = $264\mu m$. b) Profondeur = $280\mu m$. c) Profondeur = $304\mu m$.

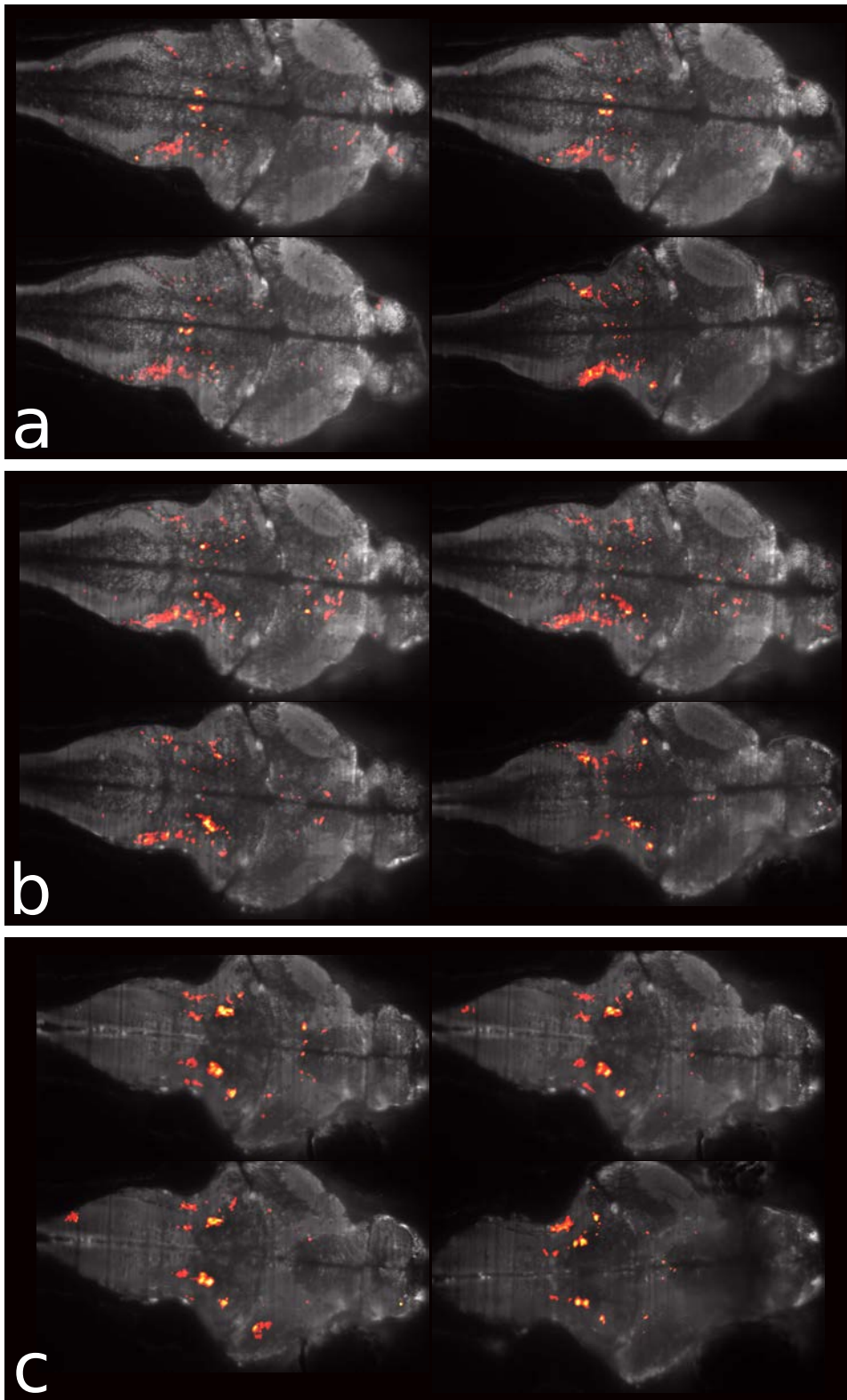


FIGURE 3.23: Zones neuronales activées pour des stimulations de moyenne amplitude ($V = 1.5\mu m$).
a) Profondeur = $264\mu m$. b) Profondeur = $280\mu m$. c) Profondeur = $304\mu m$.

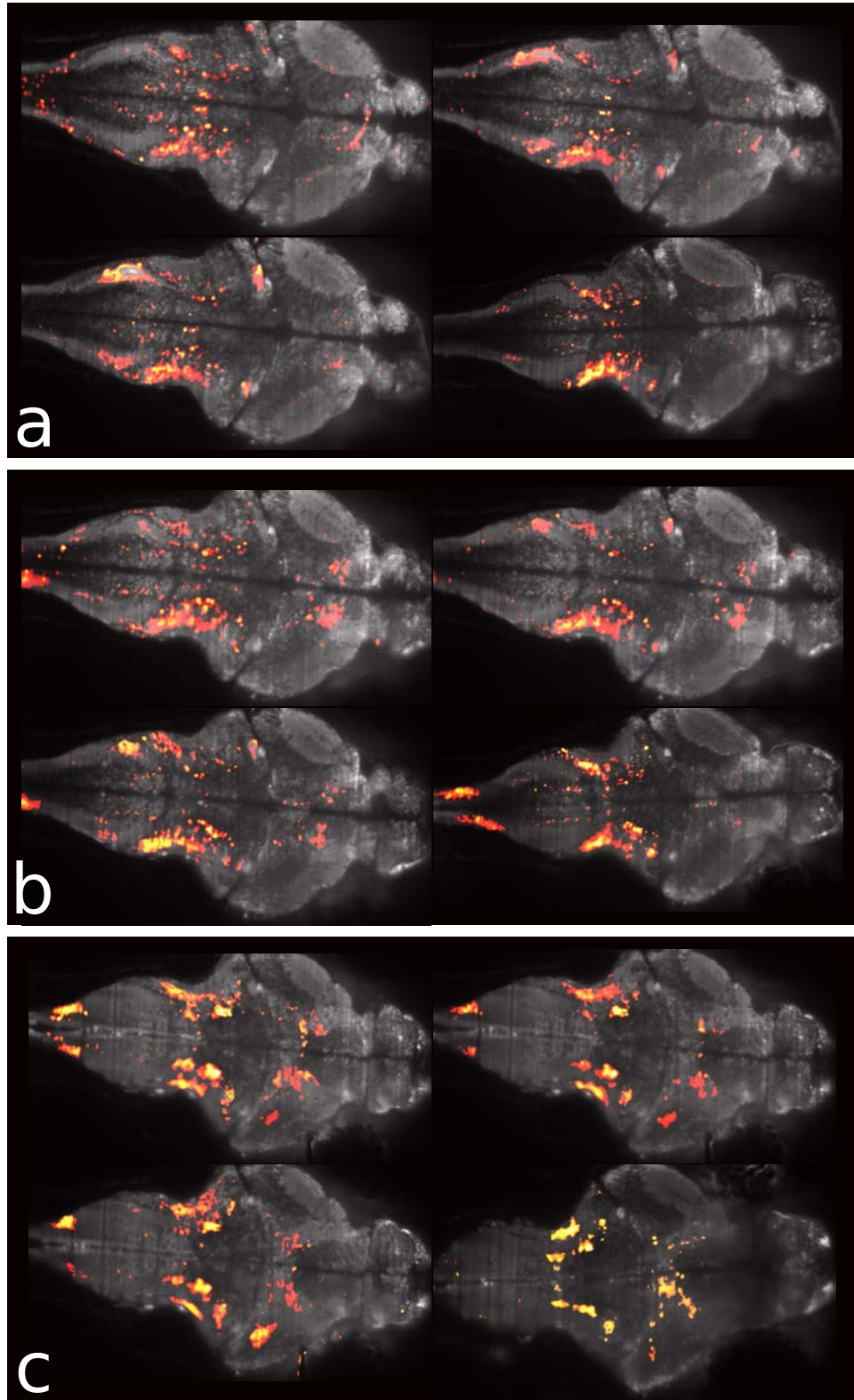


FIGURE 3.24: Zones neuronales activées pour des stimulations de forte amplitude ($V = 3.75\mu m$).
a) Profondeur = $264 \mu m$. b) Profondeur = $280 \mu m$. c) Profondeur = $304 \mu m$.

Ces observations, bien que qualitatives, donnent une orientation à l'analyse effectuée par la suite sur les populations de neurones, à l'aide de méthodes plus rigoureuses et permettant de quantifier davantage l'information contenue dans les données.

Analyse quantitative des données

Méthodes de sélection des neurones d'intérêt Après avoir calculé, pour tous les neurones de chaque couche, les réponses en termes de *DFP* et de spikes inférés, il convient de différencier les neurones qui répondent effectivement à la stimulation de ceux dont l'activité spontanée se confond avec ces éventuelles réponses. Pour cela, on définit, pour chaque valeur *V* de l'amplitude de la stimulation, le paramètre de réponse R_V , défini comme suit :

$$R_V = \frac{\langle Rep_V \rangle - \langle Spont \rangle}{std(Spont) / \sqrt{N_V}}$$

où :

- $\langle Rep_V \rangle$ est la moyenne des réponses du neurone aux stimulations de valeur *V*. C'est une mesure de l'amplitude des réponses des neurones aux stimulations de valeur *V*.
- $\langle Spont \rangle$ est la moyenne de l'activité spontanée du neurone. Cette activité spontanée est définie comme une série de points tirés aléatoirement dans les périodes considérées comme de l'activité spontanée, c'est-à-dire dans les 5 secondes précédant chaque stimulation. Pour un neurone dont l'activité est exclusivement déclenchée par les stimulations, ces valeurs doivent être nulles.
- $std(Spont)$ est la déviation standard de la distribution des valeurs de l'activité spontanée.
- N_V est le nombre de stimulations effectives pour la valeur *V* de la stimulation, pour la couche considérée. En effet, après la détection des artefacts de mouvements, certaines stimulations peuvent être ignorées si elles arrivent en même temps qu'une convulsion.

Le paramètre de réponse, calculé pour tous les neurones de la couche, pour chaque valeur de la stimulation, est un bon critère pour trier les neurones selon leur activité évoquée. Par construction, R_V doit séparer les neurones en deux catégories, visibles sur la distribution des valeurs de R_V présentée sur la figure 3.25, pour une stimulation d'une amplitude de $2\mu m$:

- Ceux qui sont situés dans une distribution à peu près gaussienne, centrée en zéro ou un peu en-dessous. Ce sont les neurones qui ne répondent pas à la stimulation.
- Ceux qui constituent la queue de la distribution, avec un paramètre R_V élevé. Ces neurones sont les neurones dont les réponses aux stimulations de valeur *V* sont supérieures à l'activité spontanée.

Un critère de seuil est donc appliqué sur les valeurs de R_V , afin d'identifier, pour chaque couche et chaque amplitude de stimulation, les populations de neurones présentant effectivement des réponses aux stimulations. Pour trouver ce seuil, un fit gaussien est réalisé sur la partie quasi-gaussienne de la distribution des R_V afin d'obtenir :

- une moyenne M
- un écart-type σ .

Par la suite, on place le seuil S à $S = M + 4\sigma$. De la sorte, on sélectionne, même au sein de la queue de la distribution, les neurones ayant répondu le plus fortement. Cela permet de s'affranchir en partie d'un défaut de l'algorithme de segmentation, qui peut considérer que la fluorescence d'un neurone augmente alors que ce sont ses voisins qui sont actifs, car leurs membranes sont en contact. Cependant, le signal dû à ce genre d'artefacts est généralement plus faible que celui d'un neurone ayant réellement répondu puisque le signal attribué à chaque neurone est la moyenne de la fluorescence sur toute la surface du neurone. Or pour un neurone ayant effectivement répondu, l'intensité de fluorescence augmente sur la totalité du cytoplasme du neurone, tandis que dans le cas d'un artefact, seule une partie du cytoplasme (au contact avec un voisin présentant une réponse) voit sa fluorescence augmenter.

La figure 3.25 présente une distribution typique des valeurs de R_V pour $V = 2\mu m$, ainsi que la valeur du seuil pour cette couche. La figure 3.26 montre une carte des neurones sélectionnés avec une couleur traduisant l'intensité R_V de la réponse des neurones.

Les premières images présentées dans la partie précédente ont inspiré le traitement de données qui va être décrit ici : en effet, selon la stimulation imposée, les groupes de neurones présentant une réponse sont différents. Les premières étapes de l'analyse ont consisté à retrouver, sur les traces des signaux des neurones obtenues grâce au traitement décrit dans la partie 3.3.2, ces comportements individuels. La figure 3.27 montre quelques traces individuelles (DFF), moyennées sur chaque valeur de la stimulation : les réponses à toutes les stimulations de chaque amplitude ont été moyennées pour tracer des courbes de DFF factices, et mises bout à bout dans le sens des amplitudes de stimulation croissantes - les amplitudes des signaux effectivement envoyés sont aléatoires.

Les neurones ainsi sélectionnés présentent des seuils de réponse différents (pour le neurone a, le seuil est 10 fois plus élevé que pour le neurone c) et des saturations plus ou moins rapides (le neurone c semble saturer bien plus tôt que le neurone d). Ces paramètres de réponse définissent les courbes de réponse des neurones.

La suite du travail d'analyse a consisté à trouver une méthode pour regrouper les neurones, toutes couches confondues, selon leur courbe de

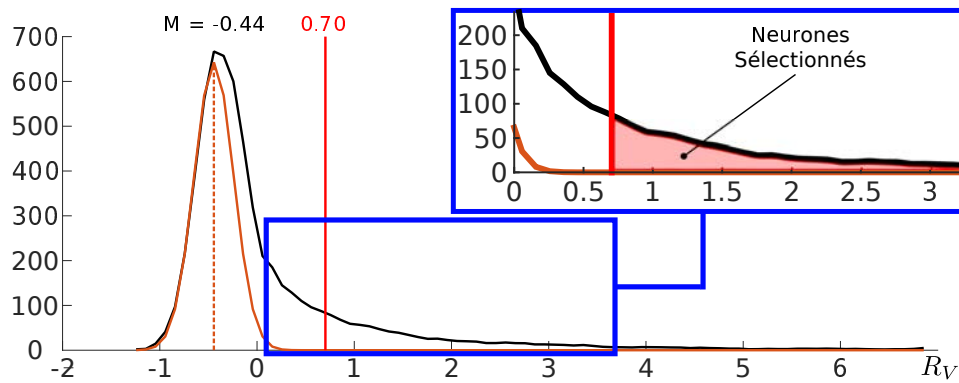


FIGURE 3.25: Distribution des valeurs de R_V pour $V = 2\mu m$, sur les 5934 neurones d'une couche.

Noir : kde (sigma = 0.1) des valeurs de R_V .

Orange : Fit gaussien sur les basses valeurs, correspondant à la population de neurone ne répondant pas à la stimulation. Le trait vertical pointillé montre la valeur moyenne de cette gaussienne.

Le trait vertical rouge indique le seuil choisi pour sélectionner les neurones étudiés dans la suite. Ici $\sigma = 0.28$, ainsi le seuil choisi est $S = 0.7$.

Cadre bleu : Zoom sur la queue de la distribution.

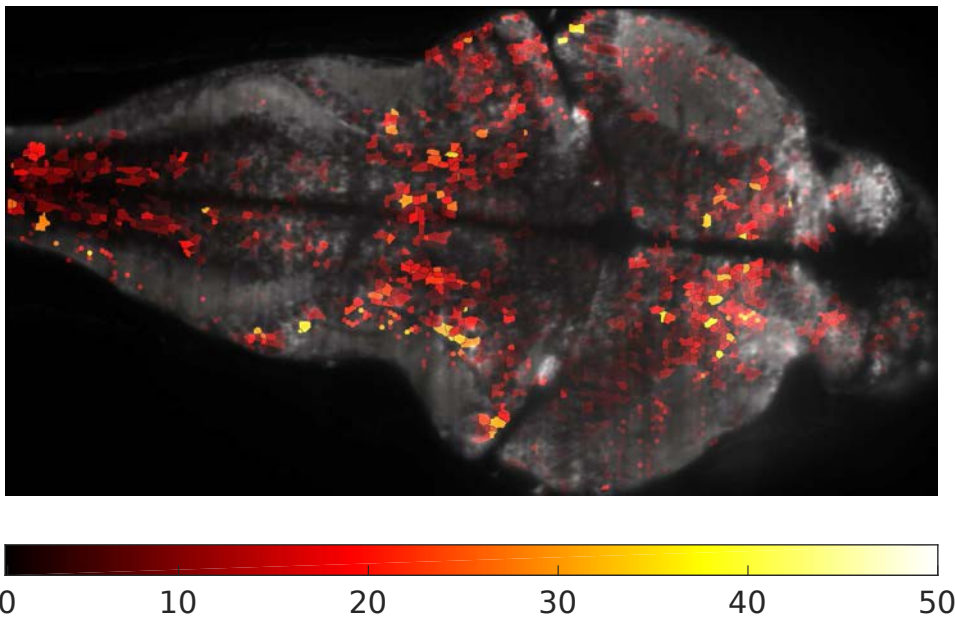


FIGURE 3.26: Exemple de tri de neurones :

Neurones sélectionnés pour leur réponse à la stimulation $V = 2\mu m$.

La couleur code pour la valeur de R_V .

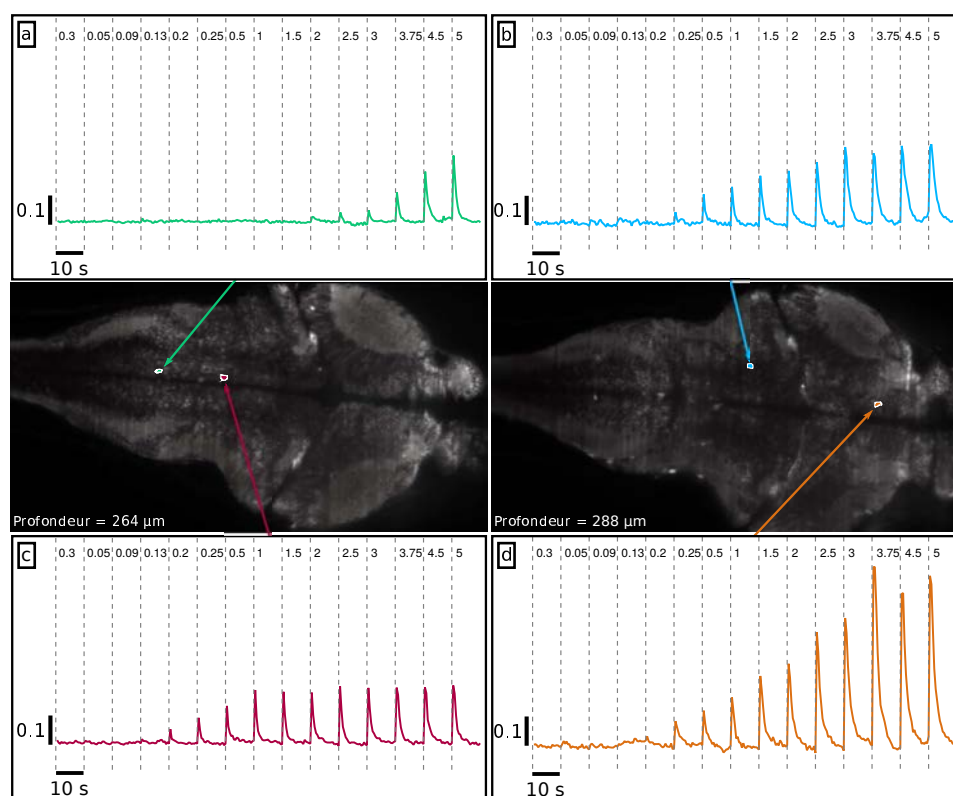


FIGURE 3.27: Traces (*DFP*) des réponses moyennées sur toutes les occurrences de chaque valeur de stimulation, présentées dans l'ordre des amplitudes croissantes (amplitudes en μm).

réponse. Dans un premier temps, la courbe de réponse de chaque neurone a été calculée : il s'agit de la courbe donnant la moyenne des valeurs de spikes inférés lors des réponses à chaque amplitude de stimulation. La figure 3.28 donne des exemples de courbes de réponse pour les différents neurones déjà utilisés en exemples sur la figure 3.27.

Plusieurs techniques de classification des neurones ont été testées, essentiellement en tentant d'ajuster les courbes de réponse par des fonctions de type sigmoïdes ou doubles fonctions affines. Cependant, ces tentatives n'ont pour l'instant pas donné de résultat satisfaisant, et il a été décidé de se contenter de repérer, pour chaque courbe de réponse, le premier point auquel le neurone présente une réponse, en termes de spikes inférés, supérieure à 1. Cela revient à définir un **seuil** de réponse (voir la figure 3.28 pour plus de détails). Pour rappel, l'unité des spikes inférés est en Signal/Bruit, donc une valeur supérieure à 1 doit nous assurer que le neurone a effectivement répondu à la stimulation d'amplitude considérée.

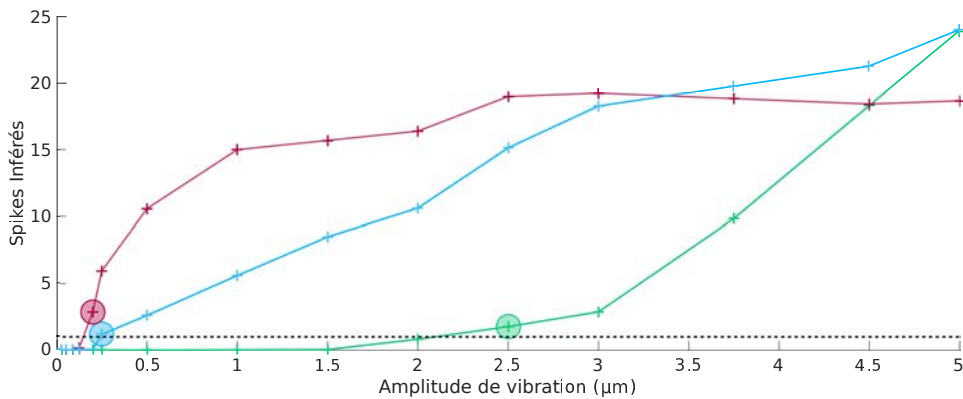


FIGURE 3.28: Courbes de réponse des neurones a (vert), b (bleu) et c (bordeaux) introduits sur la figure 3.27. Les spikes inférés sont exprimés en multiples du bruit. La ligne en pointillés noirs signale la valeur 1 au-delà de laquelle on peut considérer qu'un spike a eu lieu. Les points entourés représentent les seuils de réponse des neurones (premier point de la courbe au-delà de 1 en unités de spikes inférés).

La sélection à l'aide du paramètre de réponse R_V permet de ne conserver que les neurones dont la réponse se distingue le mieux de l'activité spontanée. Comme le montre la figure 3.29, les neurones ainsi triés ne sont pas les mêmes selon la valeur de l'amplitude de la vibration imposée à la larve. Il faut donc choisir pour l'étude des courbes de réponse l'amplitude de stimulation sélectionnant à la fois les neurones répondant à de faibles stimulations et les neurones dont le seuil de réponse est plus grand. A priori, l'amplitude de stimulation la plus élevée devrait englober tous les individus qui nous intéressent. Cependant, comme le montre par exemple l'histogramme de R_V pour $V = 4\mu m$ sur la figure 3.29, il apparaît qu'au-delà d'une amplitude de vibration de $2\mu m$, une majorité de neurones sont considérés par le programme de détection comme des neurones d'intérêt. C'est une des limitations de notre méthode d'analyse d'image et de sélection de neurones, qui peut venir entre autres du fait que pour les fortes augmentations de fluorescence (par exemple en cas de forte amplitude de vibration) de la part d'un neurone actif lors d'une stimulation, les neurones adjacents à ce neurone peuvent également voir leur fluorescence augmenter, du moins partiellement, mais suffisamment pour que notre algorithme les considère comme des neurones actifs.

Les neurones d'intérêt ont donc été choisis à partir de l'histogramme des valeurs de R_V pour $V = 2\mu m$. Les seuils de réponse de ces neurones ont été repérés à partir des courbes de réponse (cf figure 3.28). Sur la figure 3.30, on peut voir des cartes de neurones segmentées, où chaque neurone d'intérêt se

voit attribuer une couleur selon son seuil de réponse.

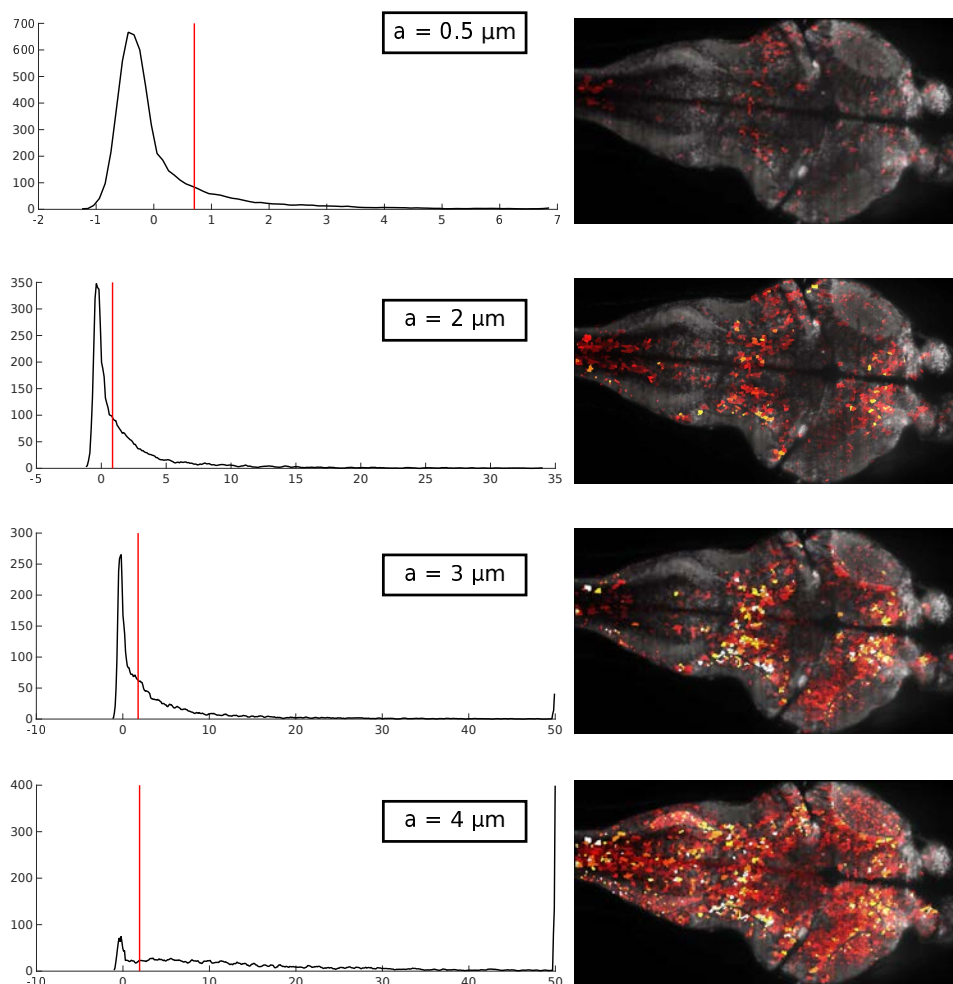


FIGURE 3.29: Histogrammes de R_V pour plusieurs amplitudes de stimulation V , pour une couche située à $280\mu\text{m}$ du sommet de la larve. Les histogrammes sont tronqués à la valeur 50, afin de garder visible la partie gaussienne. La ligne rouge indique le seuil choisi pour sélectionner les neurones d'intérêt.

$V = 0.5\mu\text{m}$ Très peu de neurones constituent la queue de la gaussienne.

$V = 2\mu\text{m}$ La queue de la gaussienne est plus longue, de nouveaux neurones sont recrutés.

$V = 3\mu\text{m}$ Le nombre de neurones avec un R_V supérieur à 50 commence à être non négligeable devant la valeur du pic de la gaussienne $V = 4\mu\text{m}$ Très peu de neurones sont contenus dans la gaussienne proche de zéro, qui est supposée rassembler tous les individus n'ayant pas répondu. A l'inverse, le nombre de neurones avec un R_V très élevé sont maintenant en majorité, ce qui n'est pas observé sur les films d'activité pour de fortes stimulations...

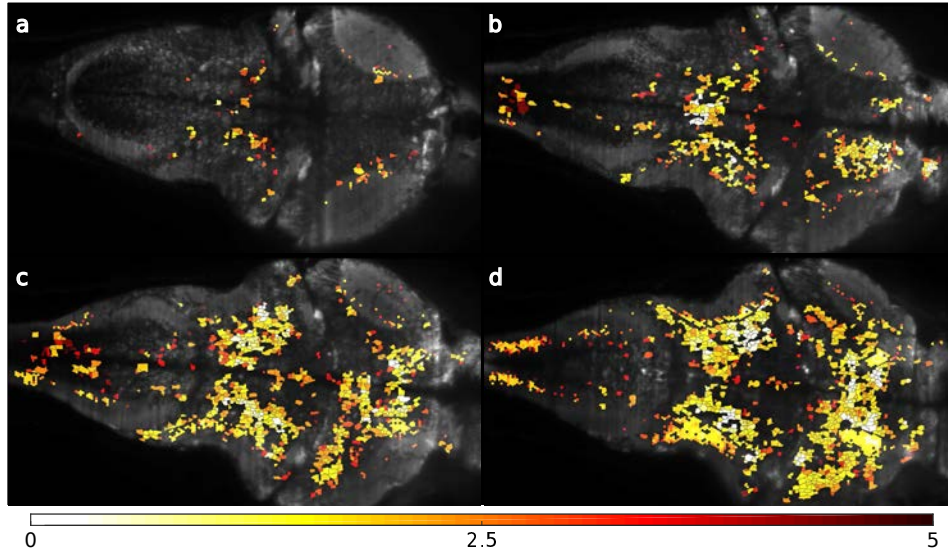


FIGURE 3.30: Cartes représentant 4 couches d'une même larve, neurones segmentés et colorés selon leur seuil de réponse (amplitude de la stimulation, μm). Profondeurs : (a) $248\mu m$, (b) $264\mu m$, (c) $280\mu m$, (a) $296\mu m$

Puis des valeurs paliers en termes d'amplitude de vibrations sont définies afin de séparer ces neurones en groupes dont les seuils sont compris entre deux de ces valeurs. Voici les différentes amplitudes qui ont été choisies pour séparer les différentes populations de neurones : $0.09\mu m$, $0.25\mu m$, $1.5\mu m$, $3\mu m$. La figure 3.31 présente les groupes de neurones de 4 couches d'une même larve répondant aux stimulations, avec une couleur selon leur seuil de réponse, noté S :

Rouges : $S < 0.25\mu m$

Verts : $0.25\mu m < S < 1.5\mu m$

Bleus : $1.5\mu m < S < 3\mu m$

Violetes : $S > 3\mu m$

Une fois les neurones d'intérêt regroupés selon leur valeur seuil, on peut tracer les courbes de réponses moyennes de chaque groupe afin d'observer des dynamiques de réponse communes à plusieurs individus. La figure 3.32 montre les courbes de réponses des neurones appartenant à chaque population de neurones. Les barres d'erreur sont calculées sur les populations, à partir des courbes de réponses moyennes de chaque individu.

Les formes de ces courbes sont en adéquation avec les images des films d'activité et les quelques traces en DFF observées sur la figure 3.27 : le groupe de neurones rouges ayant le seuil le plus bas (autour de $0.25\mu m$ d'amplitude) semble atteindre une valeur seuil (aux alentours de 15 en termes de

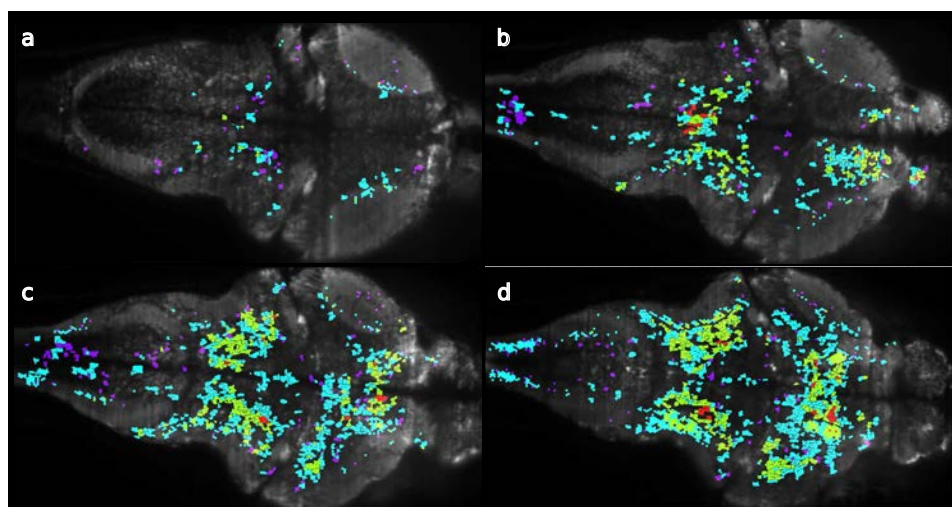


FIGURE 3.31: Cartes représentant 4 couches d'une même larve, neurones segmentés et colorés selon le groupe auxquels ils appartiennent. Profondeurs : (a) $248\mu m$, (b) $264\mu m$, (c) $280\mu m$, (a) $296\mu m$

spikes inférés) dès que l'amplitude de la vibration dépasse $3\mu m$. Le groupe de neurones aux seuils juste supérieurs à ces derniers (groupe vert) contient beaucoup plus de cellules, essentiellement présents dans le hindbrain, près des neuropiles au contact des oreilles et dans le pre-tectum et présente des courbes de réponses évoluant linéairement avec l'amplitude de la stimulation, dès lors que leur seuil de réponse est atteint. Enfin, les neurones aux seuils les plus élevés (groupes bleu et violet) semblent recrutés soit en périphérie des neurones des deux premiers groupes, soit dans les régions motrices qui, comme présenté dans les figures 3.22, 3.23 et 3.24, ont une activité significative lors des stimulations de forte amplitude, et leur courbe de réponse présente une tendance sous-linéaire, sans que l'on puisse observer aucune saturation.

Cette analyse a été effectuée sur 4 expériences retenues pour notre étude, et les résultats obtenus en termes de courbes de réponse diffèrent peu d'une larve à l'autre (voir figure 3.33), de même que les emplacements de chacun des groupes constitués par la méthode des seuils (voir figure 3.34). Cette première technique de classification, bien que basique, permet de dégager des courbes de réponses assez stéréotypées, d'un neurone à l'autre, et surtout d'un individu à un autre. Cela laisse espérer que ces étapes de sélection et de tri de neurones permettent de faire émerger des réseaux de neurones à grande échelle et sur plusieurs altitudes, en fonction des différentes réponses aux stimulations.

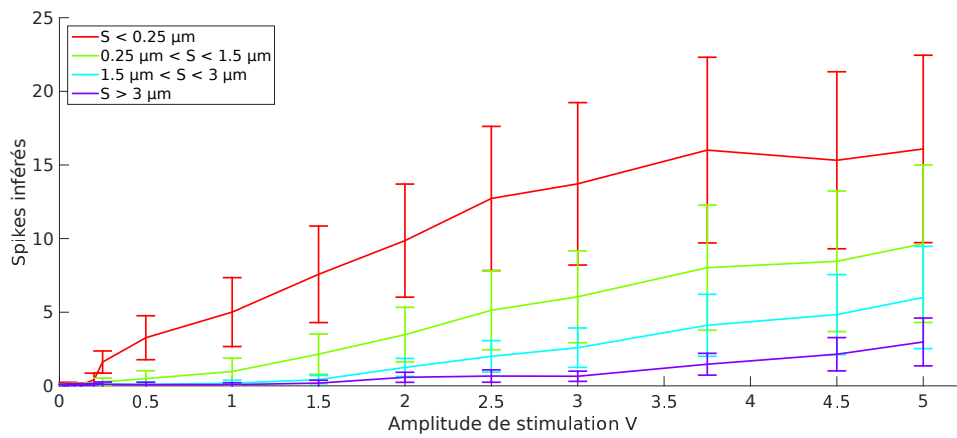


FIGURE 3.32: Courbes de réponses moyennées sur tous les neurones de chaque groupe, toutes couches confondues, en fonction de l'amplitude de la stimulation.

Pour aller plus loin, il est envisageable de pousser l'étude sur les courbes de réponse afin de faire apparaître et d'utiliser d'autres paramètres que le seuil de réponse, pour différencier les neurones selon la saturation de leur courbe de réponse ou leur pente par exemple.

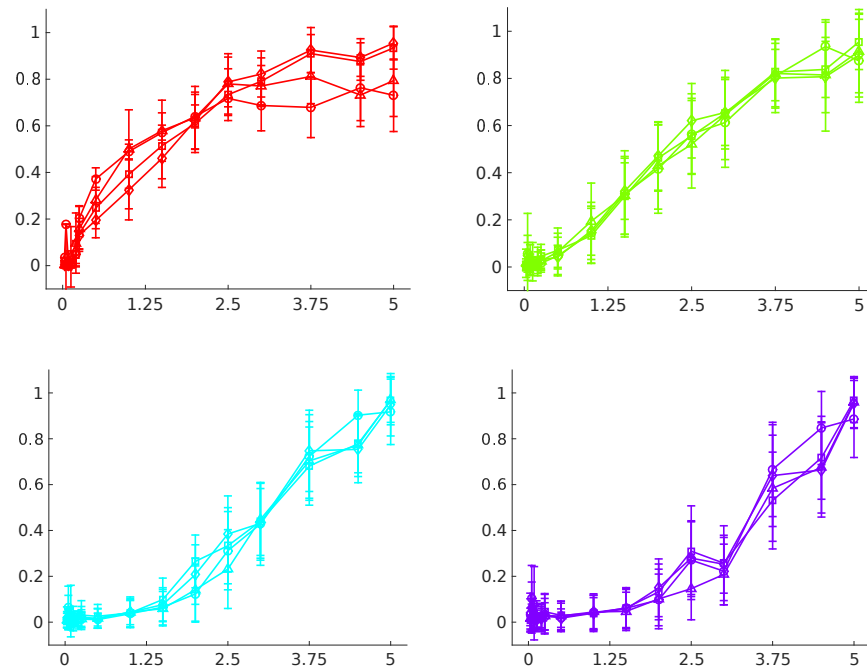


FIGURE 3.33: Courbes de réponses moyennées sur tous les neurones de chaque groupe, toutes couches confondues, en fonction de l'amplitude de la stimulation, pour 4 expériences différentes (chaque expérience est repérée par un symbole). Les valeurs ont été normalisées par la valeur maximale de chaque courbe.

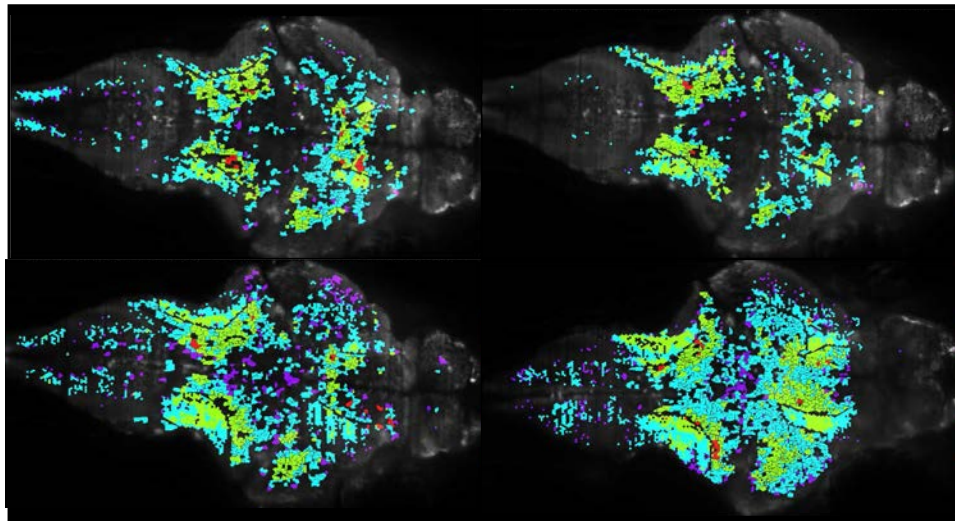


FIGURE 3.34: Répartition des neurones d'intérêt dans les groupes définis par repérage du seuil de réponse dans 4 expériences différentes, à une profondeur d'environ $296\mu m$ du sommet de la larve.

3.4.3 Expériences de type 2 : Regroupement de neurones selon leur variabilité de réponse

Les expériences de type 1, dont les résultats ont été présentés dans la partie 3.4.2, avaient pour principal objectif d'identifier les voies neuronales impliquées dans la perception des vibrations. Par ailleurs, les différentes valeurs de la stimulation ont permis de déterminer les seuils de réponse de certaines régions cérébrales et d'établir des courbes de réponse pour les neurones sélectionnés. Les expériences de type 2, où l'animal est soumis à une série de stimuli de même amplitude, ont été menées dans le but d'aller plus loin dans l'étude de l'architecture de cette chaîne de réponse, en étudiant les corrélations des fluctuations de ces réponses neuronales autour de leur valeur moyenne.

Ces fluctuations pourraient résulter de l'activité spontanée, qui se superpose à l'activité évoquée et se propage le long de la voie sensorielle étudiée. Des corrélations entre ces fluctuations pourraient donc constituer la signature d'une connectivité fonctionnelle au sein de l'ensemble des neurones d'intérêt. Cette approche basée sur des corrélations entre les signaux des neurones a déjà été effectuée sur des enregistrements d'activité spontanée [27], mais l'étude des fluctuations de réponse permet de réduire la dimensionnalité en sélectionnant une sous-population de neurones et en concentrant l'analyse sur la seule partie de l'enregistrement correspondant aux signaux de réponses évoqués par les stimulations.

Description des fluctuations

Après avoir sélectionné à l'aide du paramètre R_V les neurones dont les réponses aux stimulations se distinguaient de l'activité spontanée, il apparaît en effet que les réponses présentées par certains neurones ne sont pas toujours identiques d'une stimulation à l'autre, et que ces variations ne sont pas les mêmes pour tous les neurones. La figure 3.35 présente un extrait du signal brut de DFP pour deux neurones, ainsi que les fluctuations autour de leur valeur moyenne (décrites ci-dessous) sur l'intégralité de l'expérience.

Ces fluctuations sont calculées à partir des signaux de spikes inférés, mesurés juste après chaque stimulation. Cette mesure des réponses neuronales aux vibrations constitue une *trace* de la réponse : pour chaque neurone, le signal étudié sera donc réduit à un nombre de points égal au nombre de stimulations. A partir de cette trace, on accède aux *fluctuations* du neurone en lui soustrayant sa valeur moyenne (voir figure 3.35-b).

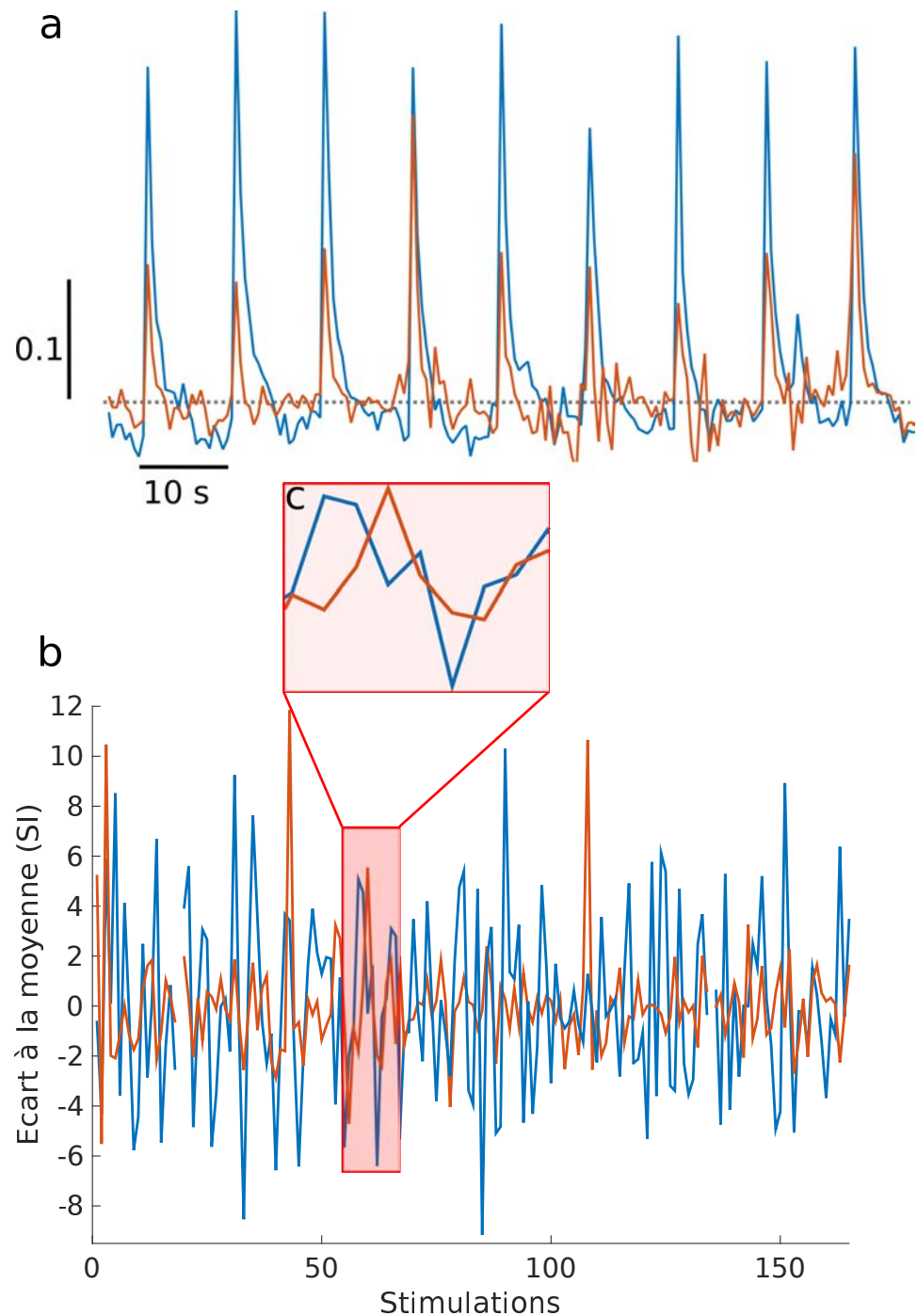


FIGURE 3.35: Illustration de la variabilité des réponses de certains neurones lorsqu'ils sont soumis à plusieurs stimulations identiques. Chaque couleur correspond à un neurone. a) Signal de DFF brut, pour 9 stimulations. b) Fluctuations des réponses autour de leur valeur moyenne (unités : Spikes inférés (SI)) sur la totalité de l'expérience, soit 165 stimulations. Les courbes sont tronquées en certains points en raison des mouvements de la larve, qui ont invalidé les signaux enregistrés lors des stimulations correspondantes (voir partie 3.3.3). c) Zoom sur la partie de la courbe de fluctuations décrivant les 9 stimulations présentées en (a).

Enveloppe globale, hypothèse d'une habituation des larves aux stimulations

La première caractéristique des signaux de fluctuations que nous avons observée est une décroissance des réponses avec le temps pour la quasi totalité des neurones. Cette enveloppe globale induit un fort biais vers les valeurs positives pour les corrélations entre ces signaux. Nous avons souhaité nous débarrasser de ce biais, puisque notre objectif était de séparer des sous-populations de neurones selon les différences présentées par leurs fluctuations de réponse. Dans ce but, pour chaque neurone, la valeur moyenne sur les 10 points autour de chaque point de la courbe est calculée (voir fig. 3.36-a) et la courbe résultante est retirée au signal de fluctuation du neurone. Dans la figure 3.36, les courbes présentées sont des moyennes sur l'ensemble de neurones d'intérêt, afin de mettre en exergue l'aspect global de ce phénomène. La transformation de la matrice des corrélations (voir 3.36-c & d) indique que cette enveloppe constituait bien un biais pour les signaux de fluctuations.

Parmi les hypothèses expliquant cette enveloppe décroissante, la plus probable serait une habituation des larves à la stimulation. Ceci reste évidemment à prouver, le temps nous ayant manqué pour étayer cette hypothèse, mais nous avons quand même tenté d'ajuster la première moitié de cette courbe par une exponentielle décroissante, afin de dégager ce qui pourrait constituer une constante de temps d'habituation des larves aux stimuli. Le résultat de cet ajustement sur tous les neurones sélectionnés de la plupart des larves est $\tau_{hab} = 9,3 \pm 2,3$ en nombre de stimulations. Si on extrapole ce nombre en secondes, cela donne une constante du temps de l'ordre de la centaine de secondes (mais rien ne prouve que ce n'est pas uniquement le nombre d'expositions à la stimulation qui est responsable de l'habituation).

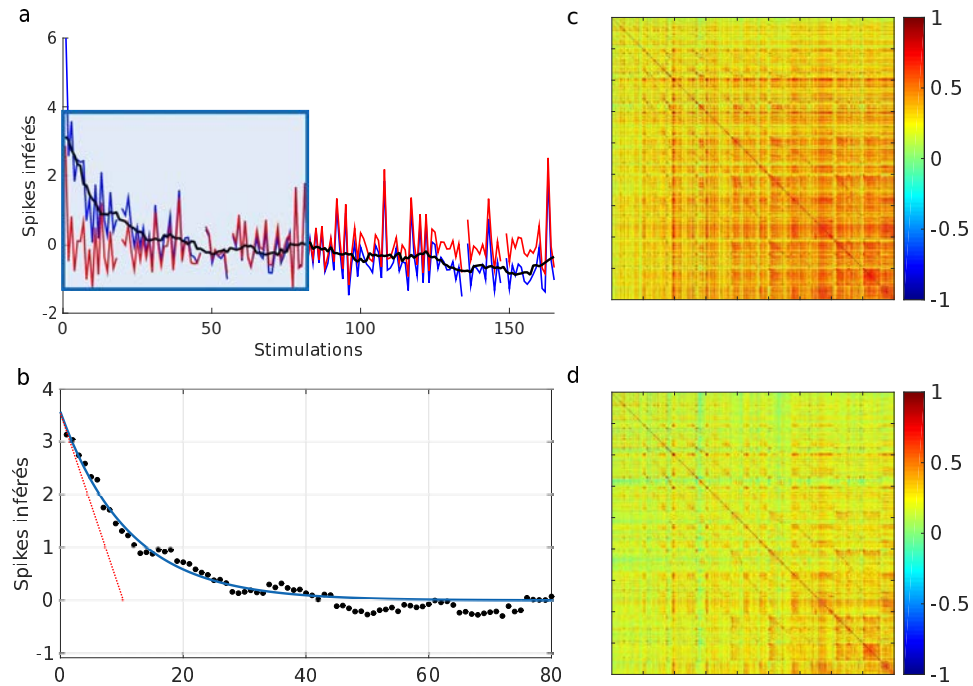


FIGURE 3.36: Influence d'une enveloppe décroissante pouvant provenir d'une habitude des larves aux stimuli sur les corrélations. a) Bleu : Moyenne des fluctuations sur tous les neurones. Noir : Enveloppe calculée en chaque point en moyennant les 10 points avoisinants. Rouge : Fluctuations globales corrigées par l'enveloppe. b) Noir : Points de l'enveloppe décroissante sur les 80 premières stimulations. Bleu : ajustement de l'enveloppe sur la première moitié de la courbe par une exponentielle décroissante. On peut tirer de cette courbe ajustée un *temps d'habitude* d'environ 10 stimulations. c) Matrice des corrélations sur les fluctuations. Les valeurs sont très fortement orientées vers les valeurs positives. d) Matrice des corrélations sur les fluctuations corrigées par l'enveloppe. Même si la majorité des valeurs restent positives, la soustraction de l'enveloppe à l'ensemble des signaux permet d'ôter un biais sur les corrélations.

Regroupement des neurones en fonction des corrélations entre leurs fluctuations à l'aide d'une Analyse en Composante Principale (ACP)

Le but de notre analyse est de former des groupes de neurones à partir des corrélations de fluctuations de leur réponses. Cependant, nous avons constaté que la majorité des neurones d'intérêt présente des fluctuations fortement corrélées, rendant impossible le processus automatique de regroupement sur la seule base des corrélations entre ces signaux, comme en témoigne la figure 3.36-d. Cela nous a empêché d'utiliser efficacement des algorithmes de clusterisation classiques de type k-means, car le résultat était généralement un cluster contenant la grande majorité des neurones.

Les corrélations sont en effet, même après avoir corrigé ce que nous supposons être un effet d'habituation, à valeurs essentiellement positives, comme on peut l'observer sur l'histogramme présenté en figure 3.37-a. Afin d'illustrer cet effet collectif, la figure 3.37-b présente les valeurs de corrélation de tous les neurones d'intérêt avec un neurone de la couche 4. Si certaines zones présentent des corrélations plus fortes que le reste, la majorité des neurones apparaissent corrélés avec le neurone sélectionné. Sur la seule base des corrélations entre les signaux de fluctuation, il est donc très délicat de distinguer différents groupes de neurones.

Il semble y avoir un effet très collectif du réseau dans les réponses neuronales observées, dont l'origine pourrait être attribuée à de faibles variations de l'amplitude de la stimulation produite par le haut-parleur d'un essai sur l'autre. Si le haut-parleur délivre bien des vibrations reproductibles, le couplage entre ces vibrations et le cylindre d'agar peut introduire des variations dans le mouvement ressenti par la larve.

En effet, comme l'indique la figure 3.37-b, les fluctuations de zones disposées symétriquement voient leurs fluctuations de réponses corrélées avec de fortes valeurs, ce qui indique que leur signaux sont très semblables. Or l'on s'attend à ce que les aires primaires de la perception auditive des deux oreilles ne soient pas fortement connectées, et donc présenter des fluctuations indépendantes dans chacune de leurs projections. L'hypothèse selon laquelle les stimuli successifs ne sont pas tous identiquement transmis à la larve nous semble donc la plus probable, car elle expliquerait pourquoi la quasi totalité des signaux enregistrés présente des fluctuations fortement corrélées.

Nous avons donc cherché à nous affranchir de ce biais de corrélation en extrayant, au moyen de l'ACP, le signal de fluctuation global.

On fait l'hypothèse que le signal du neurone i peut s'écrire, en première approximation :

$$x_i(t) = y_i(t) + k_i\alpha(t)$$

où $y_i(t)$ représente le signal de fluctuation corrigé des variations de la stimulation mécanique et $x_i(t)$ le signal mesuré. k_i est un facteur spécifique au neurone, décrivant l'amplification du bruit $\alpha(t)$ par ce dernier.

La corrélation entre les signaux de fluctuation de deux neurones s'écrit donc :

$$\langle x_i(t)x_j(t) \rangle = \langle y_i(t)y_j(t) \rangle + k_i k_j \langle \alpha^2(t) \rangle + k_i \langle y_j(t)\alpha(t) \rangle + k_j \langle y_i(t)\alpha(t) \rangle$$

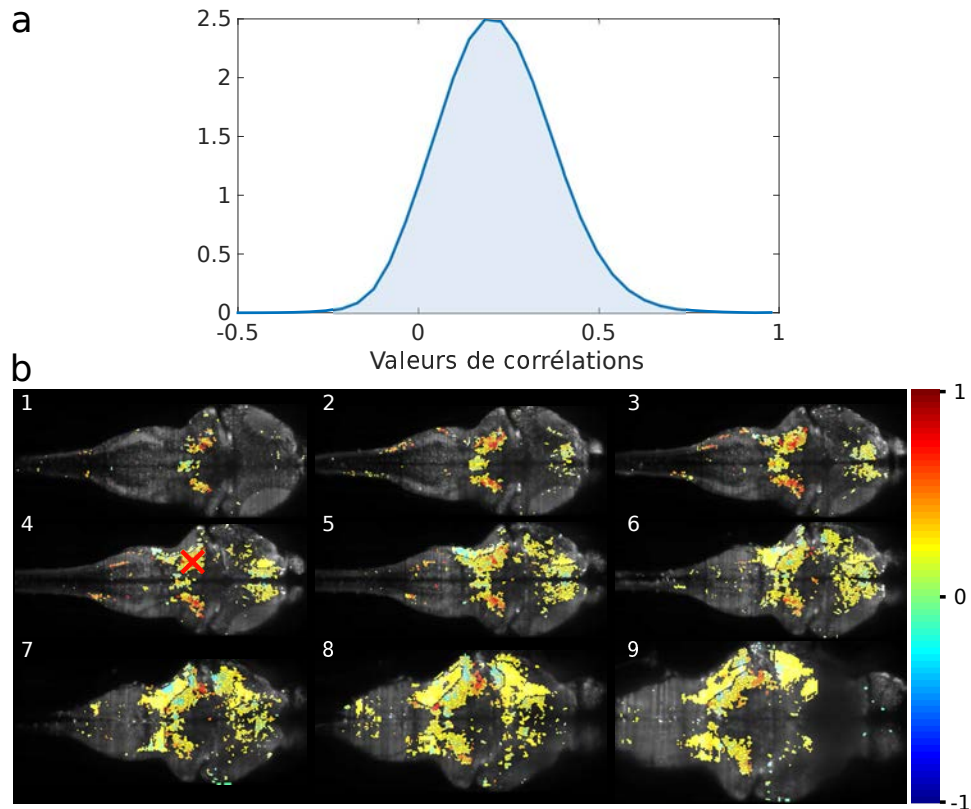


FIGURE 3.37: a) Pdf (Densité de probabilité) des corrélations sur les signaux de fluctuation, fortement orientées vers les valeurs positives. b) Cartes des valeurs de corrélations entre le signal de fluctuation d'un neurone de la couche 4, repéré par une croix rouge, avec les neurones de 8 autres couches. Même si certaines zones apparaissent plus corrélées que d'autres, la grande majorité des neurones présentent des corrélations positives ne permettant pas une séparation franche entre neurones corrélés et anti-corrélés au neurone cible.

A ce stade, en faisant l'hypothèse d'un bruit additif n'ayant aucun lien avec l'activité spontanée, les corrélations entre les vrais signaux $y_i(t)$ et $y_j(t)$ et le bruit $\alpha(t)$ sont nulles, car ces signaux sont indépendants de ce bruit. On note par ailleurs $C_{ij} = \langle y_i(t)y_j(t) \rangle$ le coefficient de corrélation entre les vrais signaux de fluctuation des neurones i et j , et $C_{ij}^{tot} = \langle x_i(t)x_j(t) \rangle$ le coefficient de corrélation effectivement mesuré.

Si on projette maintenant l'expression précédente sur le vecteur $K = \{k_1, k_2, \dots, k_j, \dots, k_N\}$, où N est le nombre total de neurones, on obtient :

$$\sum_{j=1}^N C_{ij}^{tot} k_j = \sum_{j=1}^N C_{ij} k_j + \langle \alpha^2(t) \rangle k_i \sum_{j=1}^N k_j^2$$

Or $\sum_{j=1}^N C_{ij} k_j \simeq 0$ si N est assez grand, car la distribution des vraies corrélations est supposée centrée en zéro, et indépendante de celle des k_i dans l'hypothèse d'un bruit additif. Si l'on suppose à présent que le vecteur K est normalisé ($\sum_{j=1}^N k_j^2 = 1$), on obtient :

$$\sum_{j=1}^N C_{ij}^{tot} k_j = \Lambda k_i$$

Avec $\Lambda = \langle \alpha^2(t) \rangle \sum_{j=1}^N k_j^2$, valeur propre de la matrice de corrélation pour le vecteur propre K . Par construction, on vient de mettre en évidence le premier vecteur propre de l'analyse en composante principale, associé à la valeur propre Λ .

Dans le cas d'un ensemble de signaux de fortement corrélés, le premier vecteur propre de composante principale traduit les variations globales du signal, tandis que les vecteurs propres suivants caractérisent les contributions des neurones aux différentes dispersions observées, par ordre d'importance. Ce sont donc les signaux de fluctuations corrigés par la projection de ce premier vecteur propre qui vont être utilisés pour définir de nouvelles corrélations entre les neurones. Les variations globales contenues dans le premier vecteur propre peuvent avoir pour origine les fluctuations du laser ou les déformations de l'agar à cause des vibrations, et sont, dans un premier temps, modélisées par un bruit additif $\alpha(t)$, où t indique le numéro de la stimulation.

La figure 3.38-b présente les signaux de fluctuations d'un neurone avant et après correction par le premier vecteur propre de l'ACP. La figure 3.38-a

montre l'histogramme des corrélations après cette correction. Ainsi, on voit que ce processus, même si il n'influe que légèrement sur le signal de fluctuation des neurones, permet de corriger la distribution des corrélations du biais dû à une variation collective de ces signaux.

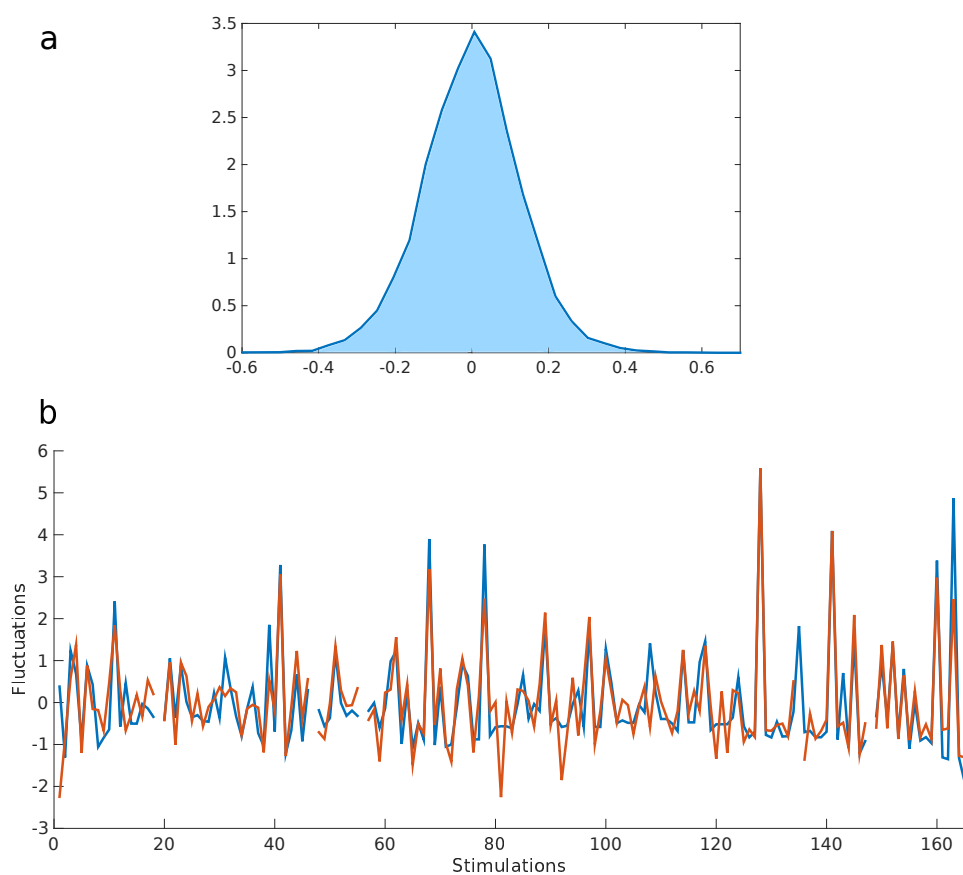


FIGURE 3.38: Bleu : signal brut de fluctuation autour de la valeur moyenne. Orange : signal corrigé par la projection du premier vecteur propre de l'analyse par composante principale.

On s'intéresse par la suite au deuxième vecteur propre de l'ACP, qui doit contenir des informations sur la dispersion du signal, et offre donc l'espoir de séparer des populations de neurones dont les fluctuations sont, au deuxième ordre, suffisamment différentes pour permettre de distinguer plusieurs groupes de neurones. Le deuxième vecteur propre, dont la taille est égale au nombre de neurones d'intérêt (toutes couches confondues), a pour coefficients les contributions respectives de chacun des neurones dans l'une ou l'autre direction de cet axe de représentation de la dispersion des signaux. La répartition des valeurs de ces coefficients au sein des neurones étudiés est indiquée par les cartes des couches 2 à 10 présentées en 3.39-a, et la distribution de ces coefficients est donnée en figure 3.39-b. Cette distribution est bimodale et permet, en posant un seuil afin de séparer les deux sous-populations composant les deux lobes de l'histogramme, de distinguer deux groupes de neurones.

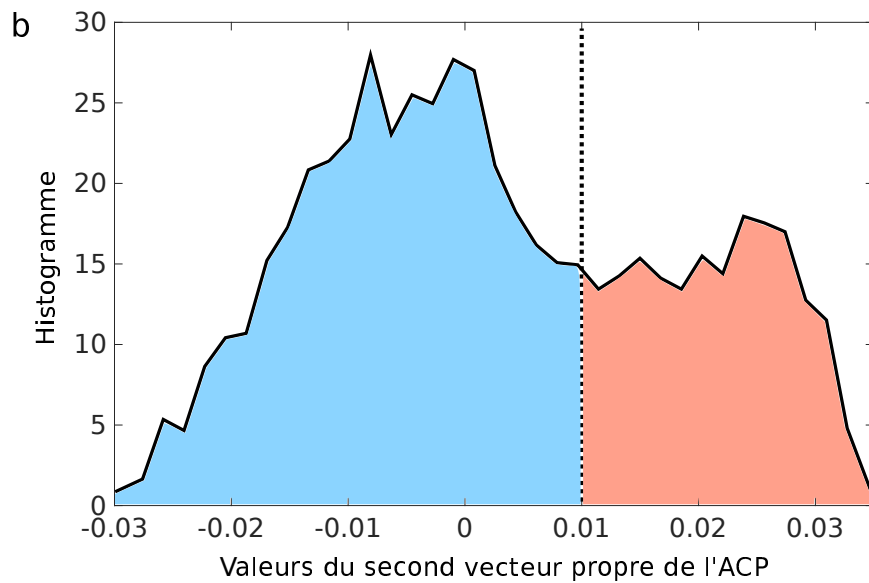
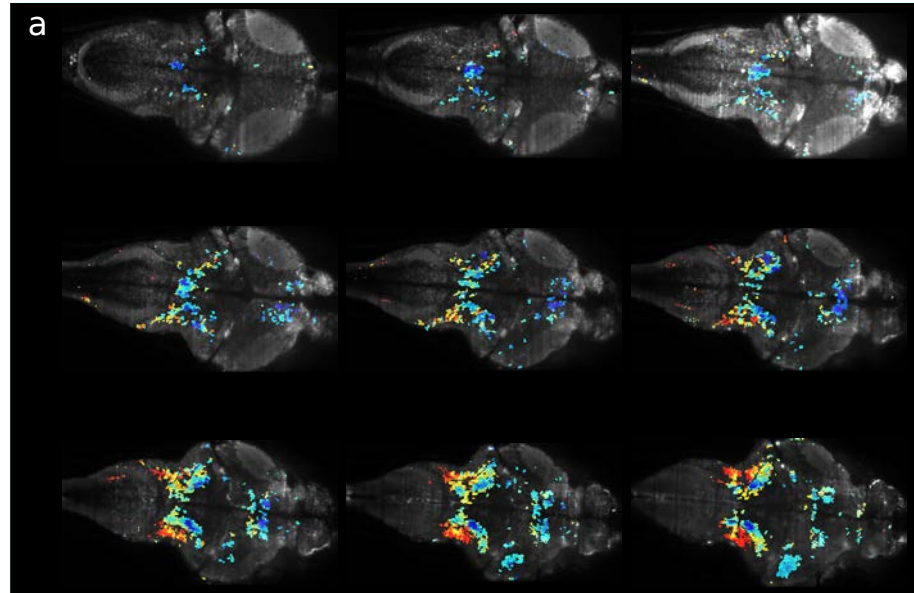


FIGURE 3.39: a) Contribution de chaque neurone d'intérêt au deuxième vecteur propre de l'ACP. Les deux lobes de l'histogramme sont colorés en rouge et bleu.

b) Histogramme des valeurs du deuxième vecteur propre de l'ACP. Un seuil a été placé à 0.01 afin de séparer deux groupes de neurones, dont les fluctuations devraient différer.

Les neurones d'intérêt sont répartis dans les deux groupes selon la valeur de leur coefficient au sein du deuxième vecteur propre, et les cartes représentant les deux sous-populations de neurones, en bleu et en rouge, sont traitées grâce aux algorithmes de CMTK pour être recalées sur une même image en 3D du cerveau de larve. La figure 3.40 montre les cartes extraites d'un tel traitement, et présente les deux groupes de neurones ainsi identifiés, sur deux larves âgées de 5 jours. Malgré certaines différences, surtout dans la partie la plus rostrale du système nerveux, cette analyse semble pouvoir dégager deux ensembles de neurones dans le rhombencéphale de façon reproductible : les noyaux MVN et MON, dont les neurones sont colorés en rouge sur la carte, appartiennent au même groupe que les neurones plus proches de l'oreille (figure 3.40-a), tandis que les neurones appartenant aux parties moins latérales du rhombencéphale comme les neurones efférents du nerf octavolatéral (dans les régions plus dorsales du système nerveux) appartiennent à l'autre groupe, ici coloré en bleu (figure 3.40-b).

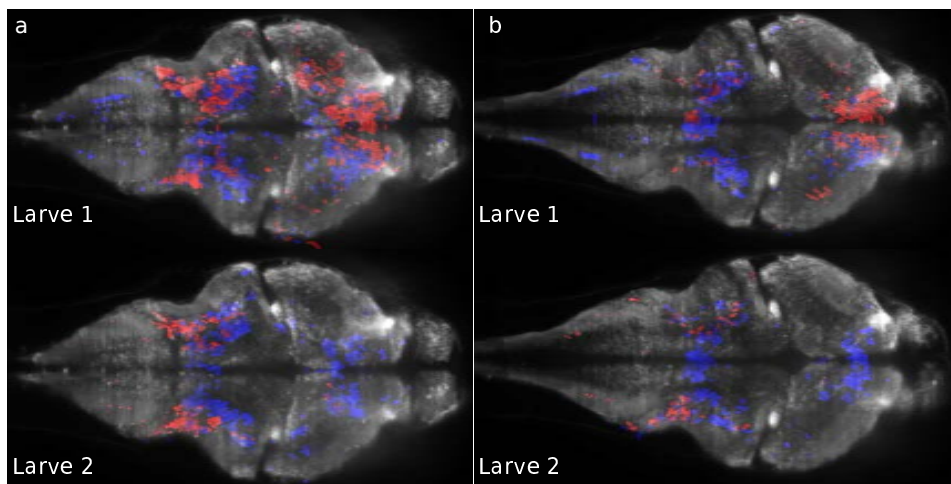


FIGURE 3.40: Séparation des neurones d'intérêt à partir d'un seuil sur les valeurs des coefficients du deuxième vecteur propre de l'ACP. Sur deux larves différentes, les deux sous-populations ainsi identifiées sont organisées selon des motifs semblables dans le rhombencéphale.

a) Les neurones appartenant aux noyaux du rhombencéphale et les neurones proches de l'oreille appartiennent au groupe coloré en rouge, indiquant de probables corrélations entre leurs signaux.

b) L'autre groupe identifié par le deuxième vecteur propre de l'ACP (en bleu) comprend des neurones moins latéraux, dont les neurones efférents du nerf octavolatéral.

Conclusion

L'objectif de cette dernière analyse était de préciser, sur la base des corrélations entre les fluctuations de réponse, les valeurs de connectivité effective au sein des neurones sélectionnés. Les premiers essais de clusterisation sur la base des corrélations brutes se sont révélées inopérantes, pour deux raisons. D'une part, nous avons identifié un mécanisme d'habituation qui conduit à produire un premier biais vers les corrélations positives. Cet effet étant corrigé, nous avons cependant observé qu'il subsistait un fort biais résiduel vers les corrélations positives sans doute dû à des modulations non contrôlées de l'amplitude des différents stimuli mécaniques.

C'est à ce stade que l'analyse en composante principale s'est révélée un outil utile : dans l'hypothèse d'un bruit additif décorréolé des fluctuations intrinsèques d'activité des neurones, cette technique nous a permis de corriger ce second biais et de retrouver une distribution centrée en 0 des corrélations de paire. Nous nous sommes alors concentrés sur la seconde composante principale dont la dynamique rend compte d'une large part des corrélations de fluctuations. Les résultats de cette analyse, testée sur 4 individus différents, ont permis de séparer deux groupes de neurones, situés dans les mêmes régions du cerveau d'une larve à l'autre. Même si ces premières analyses sont encourageantes, elles demanderaient à être testées de manière indépendante. L'utilisation de lignées *Channelrhodopsin* ou *Halorhodopsin* pour lesquels l'activité de populations neuronales peuvent être modulées optiquement, couplée à l'imagerie calcique plein champ, pourrait permettre de sonder plus directement ce réseau de connectivité.

Chapitre 4

Conclusion

Résumé

Le travail réalisé pendant mes trois ans de doctorat et décrit dans cette thèse a permis de répondre à certaines questions, tout en en posant de nouvelles au gré des résultats, des succès ou des échecs de nos expériences.

L'objectif initial de mon doctorat était d'utiliser le microscope à nappe laser, une méthode d'imagerie récemment adaptée à l'observation du système nerveux de la larve de poisson-zèbre, pour comprendre la façon dont le cerveau des larves intègre les informations sensorielles de la ligne latérale.

Plus précisément, notre étude envisageait d'étudier les voies neuronales impliquées dans la perception des écoulements par les organes de deux modalités sensorielles : les yeux pour la vision et la ligne latérale pour la mécanotransduction des stimulations hydrodynamiques. Ces deux modalités sont utilisées par les larves de poisson-zèbre pour déclencher et entretenir la *rhéotaxie*, un comportement observé chez les poissons consistant à s'aligner et à nager contre le courant afin de maintenir leur position dans le référentiel du laboratoire. La rhéotaxie est l'exemple même d'un processus multisensoriel dont les dynamiques, si elles sont comprises avec le degré de précision offert par l'imagerie calcique fonctionnelle, permettraient d'appréhender de façon plus générale des mécanismes cérébraux dont les entrées sensorielles sont issues de plusieurs modalités simultanément.

Les expériences d'imagerie fonctionnelle ont été précédées d'une expérience comportementale visant justement à séparer les influences respectives des informations visuelles et hydromécaniques sur le comportement de larves soumises à une aspiration, sur la base de leurs mouvements de nage, les deux modalités sensorielles pouvant être désactivées indépendamment. Les résultats de ces expériences ont permis de mieux comprendre leur rôle dans les comportements de rhéotaxie. La ligne latérale semble être l'organe déclenchant la réorientation des larves face au courant, tandis que l'information visuelle

est utilisée, via le réflexe opto moteur (OMR), pour maintenir leur position malgré l'écoulement..

Ces résultats ont motivé la mise au point d'expériences de stimulation de la ligne latérale sous le microscope à nappe laser. En effet, cette nouvelle technique d'imagerie fonctionnelle permet l'enregistrement de zones étendues du cerveau, et offre donc la possibilité d'étudier toutes les populations neuronales impliquées dans le processus d'intégration de stimulations hydrodynamiques, transduites par les neuromastes, organes de la ligne latérale. L'idée de cette étude était donc d'enregistrer en imagerie calcique les signaux neuronaux provoqués par la stimulation de ces neuromastes au sein de zones cérébrales correspondant aux différentes projections de la ligne latérale, les seuls enregistrements publiés à ce jour sur cette modalité sensorielle étant réalisés par électrophysiologie, sur des neurones individuels appartenant aux ganglions de la ligne latérale. Par la suite, les stimulations hydrodynamiques stimulant les larves de poisson-zèbre pouvaient être couplées avec des stimulations visuelles afin d'évaluer les contributions des deux modalités sensorielles et leurs interactions lors du processus de rhéotaxie en termes de codage neuronal.

De nombreux dispositifs ont été développés par microfabrication, et plusieurs protocoles de stimulation hydrodynamique ont été testés afin d'observer des réponses neuronales évoquées par des courants ressentis par la larve au niveau de sa queue. Aucun n'a porté ses fruits, et il a été décidé de changer de mode de stimulation pour étudier les réponses neuronales des larves à des stimulations acoustiques, la perception de vibrations étant une modalité dont les voies neuronales sont encore peu connues d'un point de vue fonctionnel, en dehors de quelques études sur les cellules de Mauthner et d'autres neurones responsables de réflexes d'échappement [101].

Les expériences réalisées grâce à notre dispositif de stimulation placé sous le microscope à nappe laser ont non seulement permis d'établir pour la première fois la carte complète du circuit impliqué dans la perception des vibrations, mais ont également été l'occasion de mettre à l'épreuve de nouvelles méthodes de traitement de données.

L'identification des zones cérébrales activées par les stimulations a été rendue possible par l'utilisation d'algorithmes CMTK permettant la fusion des données provenant de plusieurs expériences. Couplé aux informations contenues dans l'atlas *Z-Brain*, cet outil nous a permis de décrire plus précisément les régions du système nerveux où des réponses étaient observées, et de les confronter à la littérature.

L'essentiel du travail réalisé en termes de traitement des données concerne

l'analyse des images enregistrées lors des expériences. Les variations de fluorescence enregistrées pour chaque neurone ont d'abord été transformées en spikes grâce à un algorithme d'inférence, permettant de gagner en précision sur l'intensité des réponses neuronales évoquées. Les méthodes de sélection de neurones d'intérêt ont ensuite montré que l'on pouvait distinguer, sur un grand nombre d'éléments (jusqu'à 80 000 neurones sur un seul enregistrement en 3D), des populations de neurones dont les réponses provoquées par des stimulations se démarquaient bien de l'activité spontanée.

Enfin, deux méthodes de tri ont été développées pour séparer ces neurones en plusieurs groupes, d'abord sur le critère de leur sensibilité dans le cadre d'expériences où les intensité des stimulations variaient, puis à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP) sur la base de la variabilité des réponses évoquées par des stimulations d'intensité constante.

Perspectives

Les résultats présentés dans la première partie de cette thèse constituent une base comportementale solide pour étudier le codage neuronal de la perception hydrodynamique chez la larve de poisson-zèbre dans le domaine de l'imagerie fonctionnelle. Pour aller plus loin dans les expériences de comportement, d'autres protocoles sont envisageables pour confirmer les résultats entrevus lors de cette étude comme la présentation de stimuli conflictuels aux deux modalités à l'aide d'un motif défilant dans une direction opposée à celle du courant.

Les conclusions de notre étude soulèvent de nouvelles questions sur le fonctionnement de la ligne latérale et les voies neuronales qui lui sont associées, mais aussi sur les interactions entre deux modalités sensorielles chez les vertébrés et leur intrication au sein de centres de décision du système nerveux. Malgré la déception qui a accompagné les tentatives infructueuses de stimulation de la ligne latérale sous le microscope à nappe laser, ce travail préliminaire a posé les jalons de futures expériences multimodales permettant d'enregistrer simultanément l'activité évoquée par des stimulations visuelles ou hydrodynamiques, ainsi que les recouvrements et les axes de communication entre les zones cérébrales responsables de chacune de ces modalités.

Notre étude des voies neuronales impliquées dans la perception et le codage des vibrations acoustiques par les larves de poisson-zèbre présente des résultats encourageants, aussi bien par l'identification de circuits neuronaux que par les développements techniques qui ont accompagné ce travail. Ces résultats appellent de nouvelles investigations, pour lesquelles le temps à

manqué durant mon doctorat, mais dont les premières lignes ont été tracées par le travail effectué durant ma dernière année de thèse.

Les courbes de réponse des neurones d'intérêt, par exemple, pourraient être étudiées via des paramètres plus complexes qu'un simple seuil de sensibilité, et leur étude sur l'ensemble des neurones permettrait de distinguer de nouveaux groupes de neurones, que les analyses présentées précédemment ne parviennent pas à séparer. Le phénomène de l'habituation des larves à nos stimulations a été, pour notre étude, considéré comme parasitant les signaux analysés, mais pourrait à lui seul faire l'objet d'une expérience. Reste à déterminer, entre autres, si l'habituation se fait sur une durée ou sur un nombre d'occurrences de la stimulation, et si la décroissance des réponses mesurées varie avec l'intensité de cette stimulation.

Par ailleurs, nos protocoles et nos résultats pourraient être mises en parallèle avec d'autres techniques expérimentales, afin de confirmer les résultats préliminaires présentés ici. D'une part, l'utilisation de mutants dont les zones activées par nos stimulations sont marquées en fluorescence permettrait d'identifier avec plus de certitudes les populations neuronales recrutées. Ce travail devrait être réalisé sans problème par des généticiens, le poisson-zèbre étant un animal dont le génome est entièrement séquencé et a déjà été maintes fois modifié pour ce type d'expériences.

D'autre part, le développement récent de l'optogénétique permet d'envisager des protocoles complétant l'étude des corrélations de fluctuations décrite dans la dernière partie de cette thèse. Cette technique consiste, par la modification du génome, à rendre les neurones choisis photo-activables. En choisissant les neurones de certaines zones activées par les stimulations acoustiques et en déclenchant leur activité tout en observant quels autres neurones sont activés en conséquence, on pourrait remonter rapidement à des cartes de connectivité et les confronter avec les premiers résultats obtenus par l'étude des fluctuations des neurones d'intérêt autour de leur valeur moyenne.

Bibliographie

- [1] 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.
- [2] Jeff W. Lichtman and Winfried Denk. The Big and the Small : Challenges of Imaging the Brain’s Circuits. *Science*, 334(6056) :618–623, April 2011.
- [3] Marco Piccolino. Animal electricity and the birth of electrophysiology : the legacy of Luigi Galvani. *Brain Research Bulletin*, 46(5) :381–407, July 1998.
- [4] David H. Hubel and others. Tungsten microelectrode for recording from single units. *Science*, 125(3247) :549–550, 1957.
- [5] Akifumi Fujishiro, Hidekazu Kaneko, Takahiro Kawashima, Makoto Ishida, and Takeshi Kawano. In vivo neuronal action potential recordings via three-dimensional microscale needle-electrode arrays. *Scientific Reports*, 4, May 2014.
- [6] Lawrence B. Cohen and Brian M. Salzberg. Optical measurement of membrane potential. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 83*, number 83 in Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, pages 35–88. Springer Berlin Heidelberg, 1978.
- [7] Christine Grienberger and Arthur Konnerth. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73(5) :862–885, March 2012.
- [8] Werner Göbel and Fritjof Helmchen. In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22 :358–365, December 2007.
- [9] 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(5) :399–405, January 2010.

- [10] J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 19(2) :137–141, February 2001.
- [11] Tsai-Wen Chen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreier, 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.
- [12] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [13] Fritjof Helmchen and Winfried Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12) :932–940, December 2005.
- [14] Jörg Bewersdorf, Alexander Egner, and Stefan W. Hell. Multifocal multi-photon microscopy. In *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 550–560. Springer, 2006.
- [15] R. Salomé, Y. Kremer, S. Dieudonné, J. F. Léger, O. Krichevsky, C. Wyart, D. Chatenay, 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.
- [16] Paolo Pozzi, Daniela Gandolfi, Marialuisa Tognolina, Giuseppe Chirico, Jonathan Mapelli, and Egidio D’Angelo. High-throughput spatial light modulation two-photon microscopy for fast functional imaging. *Neurophotonics*, 2(1) :015005–015005, 2015.
- [17] 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, August 2004.
- [18] 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, November 2008.
- [19] 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.
- [20] Silke Rinkwitz, Philippe Mourrain, and Thomas S. Becker. Zebrafish : An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 93(2) :231–243, February 2011.
- [21] Florian Engert and Steve Wilson. Zebrafish neurobiology : From development to circuit function and behaviour. *Developmental Neurobiology*, 72(3) :215–217, March 2012.

- [22] Rainer W. Friedrich, Gilad A. Jacobson, and Peixin Zhu. Circuit Neuroscience in Zebrafish. *Current Biology*, 20(8) :R371–R381, April 2010.
- [23] 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.
- [24] H. C. Park, C. H. Kim, Y. K. Bae, S. Y. Yeo, S. H. Kim, S. K. Hong, J. Shin, K. W. Yoo, M. Hibi, T. Hirano, N. Miki, A. B. Chitnis, and T. L. Huh. Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Developmental Biology*, 227(2) :279–293, November 2000.
- [25] J. A. Lister, C. P. Robertson, T. Lepage, S. L. Johnson, and D. W. Raible. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development (Cambridge, England)*, 126(17) :3757–3767, September 1999.
- [26] Misha B. Ahrens, Michael B. Orger, Drew N. Robson, Jennifer M. Li, and Philipp J. Keller. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 10(5) :413–420, May 2013.
- [27] Thomas Panier, Sebastián A. Romano, Raphaël Olive, Thomas Pietri, Germán Sumbre, Raphaël Candelier, and Georges Debrégeas. Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using selective plane illumination microscopy. *Front Neural Circuits*, 7 :65, 2013.
- [28] Philipp J. Keller, Misha B. Ahrens, and Jeremy Freeman. Light-sheet imaging for systems neuroscience. *Nature Methods*, 12(1) :27–29, January 2015.
- [29] Nikita Vladimirov, Yu Mu, Takashi Kawashima, Davis V. Bennett, Chao-Tsung Yang, Loren L. Looger, Philipp J. Keller, Jeremy Freeman, and Misha B. Ahrens. Light-sheet functional imaging in fictively behaving zebrafish. *Nature Methods*, 11(9) :883–884, September 2014.
- [30] Thomas Panier. *Imagerie par nappe laser de l'activité neuronale dans l'ensemble du cerveau d'un poisson-zèbre*. Paris 6, January 2014.
- [31] Zhe Yang, Li Mei, Fei Xia, Qingming Luo, Ling Fu, and Hui Gong. Dual-slit confocal light sheet microscopy for in vivo whole-brain imaging of zebrafish. *Biomedical Optics Express*, 6(5) :1797, May 2015.
- [32] Sébastien Wolf, Willy Supatto, Georges Debrégeas, Pierre Mahou, Sergei G. Kruglik, Jean-Marc Sintes, Emmanuel Beaurepaire, and Raphaël Candelier. Whole-brain functional imaging with two-photon light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 12(5) :379–380, May 2015.

- [33] 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, September 2011.
- [34] Michael L. Risner, Elizabeth Lemerise, Eric V. Vukmanic, and Ashley Moore. Behavioral spectral sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*). *Vision Research*, 46(17) :2625–2635, September 2006.
- [35] S. A. Budick and D. M. O’Malley. Locomotor repertoire of the larval zebrafish : swimming, turning and prey capture. *J. Exp. Biol.*, 203(Pt 17) :2565–2579, September 2000.
- [36] Allan V. Kalueff and Jonathan M. Cachat, editors. *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*, volume 52 of *Neuromethods*. Humana Press, Totowa, NJ, 2011.
- [37] M. B. Orger, M. C. Smear, S. M. Anstis, and H. Baier. Perception of Fourier and non-Fourier motion by larval zebrafish. *Nat. Neurosci.*, 3(11) :1128–1133, November 2000.
- [38] Michael B. Orger and Herwig Baier. Channeling of red and green cone inputs to the zebrafish optomotor response. *Vis. Neurosci.*, 22(3) :275–281, June 2005.
- [39] Dimple H. Bhatt, David L. McLean, Melina E. Hale, and Joseph R. Fetcho. Grading Movement Strength by Changes in Firing Intensity versus Recruitment of Spinal Interneurons. *Neuron*, 53(1) :91–102, January 2007.
- [40] Ruben Portugues and Florian Engert. The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 19(6) :644–647, December 2009.
- [41] Shane P. Windsor, Stuart E. Norris, Stuart M. Cameron, Gordon D. Mallinson, and John C. Montgomery. The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II : gliding parallel to a wall. *J Exp Biol*, 213(22) :3832–3842, November 2010.
- [42] Shane P. Windsor, Stuart E. Norris, Stuart M. Cameron, Gordon D. Mallinson, and John C. Montgomery. The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part I : open water and heading towards a wall. *J Exp Biol*, 213(22) :3819–3831, November 2010.
- [43] A. G. Carton and J. C. Montgomery. Responses of lateral line receptors to water flow in the Antarctic notothenioid, *Trematomus bernacchii*. 2002.
- [44] John C. Montgomery, Cindy F. Baker, and Alexander G. Carton. The lateral line can mediate rheotaxis in fish. *Nature*, 389(6654) :960–963, October 1997.

- [45] Arminda Suli, Glen M. Watson, Edwin W. Rubel, and David W. Raible. Rheotaxis in Larval Zebrafish Is Mediated by Lateral Line Mechanosensory Hair Cells. *PLoS One*, 7(2), February 2012.
- [46] M. J. McHenry, K. E. Feitl, J. A. Strother, and W. J. Van Trump. Larval zebrafish rapidly sense the water flow of a predator's strike. *Biol. Lett.*, 5(4) :477–479, August 2009.
- [47] Julia Olszewski, Melanie Haehnel, Masashige Taguchi, and James C. Liao. Zebrafish Larvae Exhibit Rheotaxis and Can Escape a Continuous Suction Source Using Their Lateral Line. *PLoS ONE*, 7(5) :e36661, May 2012.
- [48] John Montgomery, Guy Carton, Rainer Voigt, Cindy Baker, and Carol Diebel. Sensory processing of water currents by fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 355(1401) :1325–1327, September 2000.
- [49] Boris P. Chagnaud, Michael H. Hofmann, and Joachim Mogdans. Responses to dipole stimuli of anterior lateral line nerve fibres in goldfish, *Carassius auratus*, under still and running water conditions. *J Comp Physiol A*, 193(2) :249–263, October 2006.
- [50] Matthew J. McHenry and Sietse M. van Netten. The flexural stiffness of superficial neuromasts in the zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Journal of Experimental Biology*, 210(23) :4244–4253, January 2007.
- [51] Matthew J. McHenry, James A. Strother, and Sietse M. van Netten. Mechanical filtering by the boundary layer and fluid–structure interaction in the superficial neuromast of the fish lateral line system. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(9) :795–810, August 2008.
- [52] Christine Dambly-Chaudière, Dora Sapède, Fabien Soubiran, Kelly Decorde, Nicolas Gompel, and Alain Ghysen. The lateral line of zebrafish : a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 95(9) :579–587, December 2003.
- [53] Alain Ghysen and Christine Dambly-Chaudière. Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(1) :67–73, February 2004.
- [54] Brian M. McDermott Jr., Yukako Asai, Jessica M. Baucom, Shradha D. Jani, Yaneth Castellanos, Gustavo Gomez, James M. McClintock, Catherine J. Starr, and A. J. Hudspeth. Transgenic labeling of hair cells in the zebrafish acousticolateralis system. *Gene Expression Patterns*, 10(2–3) :113–118, February 2010.
- [55] J. A Williams and N Holder. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing Research*, 143(1–2) :171–181, May 2000.

- [56] James C. Liao and Melanie Haehnel. Physiology of afferent neurons in larval zebrafish provides a functional framework for lateral line somatotopy. *Journal of Neurophysiology*, 107(10) :2615–2623, May 2012.
- [57] Daniel Alexandre and Alain Ghysen. Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13) :7558–7562, June 1999.
- [58] Adèle Faucherre, Jesús Pujol-Martí, Koichi Kawakami, and Hernán López-Schier. Afferent Neurons of the Zebrafish Lateral Line Are Strict Selectors of Hair-Cell Orientation. *PLoS ONE*, 4(2) :e4477, February 2009.
- [59] Takayuki Sassa, Hidenori Aizawa, and Hitoshi Okamoto. Visualization of two distinct classes of neurons by *gad2* and *zic1* promoter/enhancer elements in the dorsal hindbrain of developing zebrafish reveals neuronal connectivity related to the auditory and lateral line systems. *Developmental Dynamics*, 236(3) :706–718, March 2007.
- [60] Ryann M. Fame, Carole Brajon, Alain Ghysen, and others. Second-order projection from the posterior lateral line in the early zebrafish brain. *Neural Dev*, 1(4) :330, 2006.
- [61] Thomas Mueller. What is the Thalamus in Zebrafish? *Frontiers in Neuroscience*, 6, May 2012.
- [62] Josef G. Trapani and Teresa Nicolson. Chapter 8 - Physiological Recordings from Zebrafish Lateral-Line Hair Cells and Afferent Neurons. In Monte Westerfield and Leonard I. Zon H. William Detrich, editor, *Methods in Cell Biology*, volume 100 of *The Zebrafish : Cellular and Developmental Biology, Part A*, pages 219–231. Academic Press, 2010.
- [63] Francisco A. Olivari, Pedro P. Hernández, and Miguel L. Allende. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res.*, 1244 :1–12, December 2008.
- [64] Alexandre Pouget, Jeffrey M. Beck, Wei Ji Ma, and Peter E. Latham. Probabilistic brains : knowns and unknowns. *Nature Neuroscience*, 16(9) :1170–1178, September 2013.
- [65] Raphaël Candelier, Meena Sriti Murmu, Sebastián Alejo Romano, Adrien Jouary, Georges Debrégeas, and Germán Sumbre. A microfluidic device to study neuronal and motor responses to acute chemical stimuli in zebrafish. *Scientific Reports*, 5 :12196, July 2015.
- [66] Julie A. Harris, Alan G. Cheng, Lisa L. Cunningham, Glen MacDonald, David W. Raible, and Edwin W. Rubel. Neomycin-Induced Hair Cell Death and Rapid Regeneration in the Lateral Line of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 4(2) :219–234, May 2003.

- [67] Horst Bleckmann. 3-D-orientation with the octavolateralis system. *Journal of Physiology-Paris*, 98(1–3) :53–65, January 2004.
- [68] Arthur N. Popper, William M. Saidel, and Janet S. Y. Chang. Two types of sensory hair cell in the saccule of a teleost fish. *Hearing Research*, 64(2) :211–216, January 1993.
- [69] Arthur N. Popper, Christopher Platt, and William M. Saidel. Acoustic functions in the fish ear. *Trends in Neurosciences*, 5 :276–280, 1982.
- [70] R. W. Gauldie. Polymorphic crystalline structure of fish otoliths. *Journal of Morphology*, 218(1) :1–28, October 1993.
- [71] Tanja Schulz-Mirbach, Martin Heß, and Brian D. Metscher. Sensory epithelia of the fish inner ear in 3d : studied with high-resolution contrast enhanced microCT. *Frontiers in Zoology*, 10(1) :63, October 2013.
- [72] Arthur N. Popper and Zhongmin Lu. Structure–function relationships in fish otolith organs. *Fisheries Research*, 46(1–3) :15–25, May 2000.
- [73] Mardi C. Hastings and Arthur N. Popper. *Effects of sound on fish*. California Department of Transportation, 2005.
- [74] Van Bergeijk. Marine bio-acoustics. pages 281–299. Tavolga, 1964.
- [75] Maya Inoue, Masashi Tanimoto, and Yoichi Oda. The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Scientific Reports*, 3, July 2013.
- [76] Cecilia Lanny Winata, Svetlana Korzh, Igor Kondrychyn, Weiling Zheng, Vladimir Korzh, and Zhiyuan Gong. Development of zebrafish swimbladder : The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Developmental Biology*, 331(2) :222–236, July 2009.
- [77] Kenneth G. Foote. Rather high frequency sound scattering by swimbladdered fish. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 78(2) :688–700, August 1985.
- [78] John U. Ramcharitar, Dennis M. Higgs, and Arthur N. Popper. Audition in sciaenid fishes with different swim bladder-inner ear configurations. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 119(1) :439–443, January 2006.
- [79] James G. Canfield and Robert C. Eaton. Swimbladder acoustic pressure transduction initiates Mauthner-mediated escape. *Nature*, 347(6295) :760–762, October 1990.
- [80] Gloria E. Meredith and Ann B. Butler. Organization of eighth nerve afferent projections from individual endorgans of the inner ear in the teleost, *Astronotus ocellatus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 220(1) :44–62, October 1983.

- [81] Robert C. Eaton and Charles B. Kimmel. Directional sensitivity of the Mauthner cell system to vibrational stimulation in zebrafish larvae. *Journal of comparative physiology*, 140(4) :337–342, December 1980.
- [82] R. R. Fay and P. L. Edds-Walton. Bimodal Units in the Torus Semicircularis of the Toadfish (*Opsanus tau*). *The Biological Bulletin*, 201(2) :280–281, January 2001.
- [83] Georg F. Striedter. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(2) :311–331, October 1991.
- [84] Christopher B. Braun and Olav Sand. Functional Overlap and Nonoverlap Between Lateral Line and Auditory Systems. In Sheryl Coombs, Horst Bleckmann, Richard R. Fay, and Arthur N. Popper, editors, *The Lateral Line System*, number 48 in Springer Handbook of Auditory Research, pages 281–312. Springer New York, 2013.
- [85] Pascal I Bang, Pamela C Yelick, Jarema J Malicki, and William F Sewell. High-throughput behavioral screening method for detecting auditory response defects in zebrafish. *Journal of Neuroscience Methods*, 118(2) :177–187, August 2002.
- [86] Andrea L. Cervi, Kirsten R. Poling, and Dennis M. Higgs. Behavioral Measure of Frequency Detection and Discrimination in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, 9(1) :1–7, February 2012.
- [87] Christopher Platt. Zebrafish inner ear sensory surfaces are similar to those in goldfish. *Hearing Research*, 65(1–2) :133–140, February 1993.
- [88] Tanya T. Whitfield, Bruce B. Riley, Ming-Yung Chiang, and Bryan Phillips. Development of the zebrafish inner ear. *Developmental Dynamics*, 223(4) :427–458, April 2002.
- [89] Catherine Haddon and Julian Lewis. Early ear development in the embryo of the Zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology*, 365(1) :113–128, January 1996.
- [90] Bruce B. Riley, Chenwei Zhu, Chris Janetopoulos, and Karl J. Aufderheide. A Critical Period of Ear Development Controlled by Distinct Populations of Ciliated Cells in the Zebrafish. *Developmental Biology*, 191(2) :191–201, November 1997.
- [91] Dennis M. Higgs, Audrey K. Rollo, Marcy J. Souza, and Arthur N. Popper. Development of form and function in peripheral auditory structures of the zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113(2) :1145, 2003.
- [92] Ashwin A. Bhandiwad, David G. Zeddies, David W. Raible, Edwin W. Rubel, and Joseph A. Sisneros. Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *The Journal of Experimental Biology*, 216(18) :3504–3513, September 2013.

- [93] Robert Earle Waterman and Danny H. Bell. Epithelial fusion during early semicircular canal formation in the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The Anatomical Record*, 210(1) :101–114, September 1984.
- [94] David G. Zeddies and Richard R. Fay. Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *The Journal of Experimental Biology*, 208(7) :1363–1372, January 2005.
- [95] Arthur N. Popper and Richard R. Fay. Rethinking sound detection by fishes. *Hearing Research*, 273(1–2) :25–36, March 2011.
- [96] Craig A. Radford, John C. Montgomery, Paul Caiger, and Dennis M. Higgs. Pressure and particle motion detection thresholds in fish : a re-examination of salient auditory cues in teleosts. *The Journal of Experimental Biology*, 215(19) :3429–3435, January 2012.
- [97] Nicolas Yvan Masse, Sebastian Cachero, Aaron Ostrovsky, and Gregory S. X. E. Jefferis. A mutual information approach to automate identification of neuronal clusters in *Drosophila* brain images. *Frontiers in Neuroinformatics*, 6 :21, 2012.
- [98] <http://engertlab.fas.harvard.edu/Z-Brain/about.html>.
- [99] Alix M.B. Lacoste, David Schoppik, Drew N. Robson, Martin Haese-meyer, Ruben Portugues, Jennifer M. Li, Owen Randlett, Caroline L. Wee, Florian Engert, and Alexander F. Schier. A Convergent and Essential Interneuron Pathway for Mauthner-Cell-Mediated Escapes. *Current Biology*, 25(11) :1526–1534, June 2015.
- [100] Minoru Koyama, Amina Kinkhabwala, Chie Satou, Shin-ichi Higashi-jima, and Joseph Fetcho. Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3) :1170–1175, January 2011.
- [101] Tsunehiko Kohashi and Yoichi Oda. Initiation of Mauthner- or Non-Mauthner-Mediated Fast Escape Evoked by Different Modes of Sensory Input. *The Journal of Neuroscience*, 28(42) :10641–10653, October 2008.